

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2003 年 7 月 31 日 (31.07.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/061687 A1

- (51) 国際特許分類: A61K 38/36, 9/08, 47/10, 47/18, 47/26, A61P 1/16, 3/10, 7/00, 7/02, 9/00, 9/08, 9/10, 15/00
- (21) 国際出願番号: PCT/JP03/00339
- (22) 国際出願日: 2003 年 1 月 17 日 (17.01.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2002-9951 2002 年 1 月 18 日 (18.01.2002) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 旭化成株式会社 (ASAHI KASEI KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒530-8205 大阪府 大阪市 北区堂島浜 1 丁目 2 番 6 号 Osaka (JP).
- (72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 西尾 文秀 (NISHIO, Fumihide) [JP/JP]; 〒411-0804 静岡県 三島市 多呂 126-1 メゾン落合 201 Shizuoka (JP).
- (74) 代理人: 藤野 清也, 外 (FUJINO, Seiya et al.); 〒160-0004 東京都 新宿区 四谷 1 丁目 2 番 1 号 三浜ビル 8 階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

[続葉有]

(54) Title: HIGH-CONCENTRATION PREPARATION OF SOLUBLE THROMBOMODULIN

(54) 発明の名称: 可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤

(57) Abstract: In preparing a soluble thrombomodulin solution having a concentration of as high as 10 mg/mL or above, foam-inhibiting effect can be attained by any means selected from among (a) incorporation of a nonionic surfactant, benzyl alcohol or chlorobutanol, (b) application of silicone coating on the inner wall of the vessel to be used in dissolving the freeze-dried preparation, and (c) evacuation of the vessel in dissolving the freeze-dried preparation. Further, a soluble thrombomodulin freeze-dried preparation excellent in stability is also provided which can be dissolved in 0.1 to 2 mL of an aqueous solution for dissolution to give a soluble thrombomodulin solution having a concentration of as high as 10 mg/mL or above and exhibiting an osmotic pressure ratio of 0.5 to 2.0.

(57) 要約:

10 mg/mL 以上の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有溶液を調製するに際し、
(a) 非イオン性界面活性剤、ベンジルアルコールまたはクロロブタノールを存在せしめること、(b) 該凍結乾燥製剤を溶解する際の容器の内壁がシリコーンでコーティングされていること、または(c) 該凍結乾燥製剤を溶解する際の容器内圧力が減圧状態とすること、のいずれかの処理により起泡抑制の効果を得る。また、可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤は、0.1 mL から 2 mL の溶解用水溶液に溶解し得て、10 mg/mL 以上の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有溶液を調製でき、その溶解時の浸透圧比が 0.5 から 2.0 となる安定性の高い可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤が提供される。



(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 *PCT* ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明細書

可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤

技術分野

本発明は、可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤を溶解して可溶性トロンボモジュリン高濃度含有溶液を調製するに際しての起泡抑制方法、および該凍結乾燥製剤中の可溶性トロンボモジュリンの安定化方法、およびそれらに適した可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤とそのキット製剤に関する。

背景技術

トロンボモジュリンは、トロンビンと特異的に結合し、トロンビンによるプロテインCの活性化を著しく促進する作用を有する物質として発見された。プロテインCは、血液凝固線溶系において重要な役割を演じているビタミンK依存性の蛋白質であり、トロンビンの作用により活性化され、活性型プロテインCとなる。この活性型プロテインCは、生体内で血液凝固系因子の活性型第V因子、および活性型第VIII因子を失活させ、また血栓溶解作用を有するプラスミノーゲンアクチベーターの産生に関与していることが知られている[鈴木宏治、医学のあゆみ、第125巻、901頁(1983年)]。

したがって、トロンボモジュリンは、このトロンビンによるプロテインCの活性化を促進して抗血液凝固剤又は血栓溶解剤として有用であるとされている。また、従来トロンボモジュリンの用途としては、例えば、急性冠動脈症候群(ACS)、血栓症、末梢血管閉塞症、閉塞性動脈硬化症、血管炎、心臓手術に続発する機能性障害、臓器移植の合併症、血管内血液凝固症候群(DIC)、狭心症、一過性脳虚血発作、妊娠中毒症、糖尿病、肝VOD(Liver veno-occlusive disease; 劇症肝炎や骨髄移植後の肝静脈閉塞症)、深部静脈血栓症(DVT; Deep venous thrombosis)等や、さらには敗血症や成人呼吸窮迫症候群(ARDS)の疾患の治療および予防に用いられることが期待されている。

従来、トロンボモジュリンは、ヒトをはじめとする種々の動物種の血管内皮細

胞上に発現している糖蛋白質として発見取得され、その後、クローニングに成功した。即ち、遺伝子工学的手法を用いてヒト肺 cDNA ライブラリーからシグナルペプチドを含むヒトロンボモジュリン前駆体の遺伝子をクローニングし、そしてトロンボモジュリンの全遺伝子配列を解析し、18 アミノ酸残基のシグナルペプチドを含む 575 残基のアミノ酸配列が明らかにされている（特開昭 64-6219 号公報）。シグナルペプチドが切断されたマチュアなトロンボモジュリンは、そのマチュアなペプチドの N 末端側より N 末端領域（1-226 番目）、6 つの EGF 様構造をもつ領域（227-462 番目）、O 型糖鎖付加領域（463-498 番目）、膜貫通領域（499-521 番目）、そして細胞質内領域（522-557 番目）の 5 つの領域から構成されており、そして全長のトロンボモジュリンと同じ活性を有する部分としては、6 つの EGF 様構造を持つ領域のうち、主には N 末端側から 4, 5, 6 番目の EGF 様構造からなる部分であることが知られている [M. Zushi ら、J. Biol. Chem., 246, 10351-10353 (1989)]。

少なくとも、膜貫通領域を含有しないように調製された可溶性トロンボモジュリンにおいては、界面活性剤の非存在下でもきれいに溶解することができ、例えば、N 末端領域と 6 つの EGF 様構造をもつ領域と O 型糖鎖付加領域の 3 つの領域のみからなる（即ち、配列番号 1 の 19~516 位のアミノ酸配列からなる）可溶性トロンボモジュリンは、組換え技術の応用により取得できること、そしてその組換え体可溶性トロンボモジュリンは、天然のトロンボモジュリンの活性を有していることが確認されている（特開昭 64-6219 号公報）。他に可溶性トロンボモジュリンの例として、特開平 2-255699 号公報、特開平 3-133380 号公報、特開平 3-259084 号公報、特開平 4-210700 号公報、特開平 5-213998 号公報、W092/00325 号公報、W092/03149 号公報、W093/15755 号公報等に記載の可溶性トロンボモジュリンが挙げられる。あるいは天然型としてヒト尿由来の可溶性トロンボモジュリン（特開平 3-86900 号公報、特開平 3-218399 号公報）等も例示される。

因みに、遺伝子においては、自然の変異または取得時の変異により、多くのケースで認められる通り、ヒトにおいても多形性の変異が見つけられており、上述の 575 残基のアミノ酸配列からなるヒトトロンボモジュリン前駆体の第 473 位のアミノ酸において Val であるものと、Ala であるものが現在確認されている。こ

のアミノ酸をコードする塩基配列においては、第 1418 位において、それぞれ T と C との変異に相当する[Wen ら、Biochemistry, 26, 4350-4357(1987)]。しかし、活性および物性においては、全く相違なく、両者は実質的に同一と判断できる。

発明の開示

これらの可溶性トロンボモジュリンを医薬組成物として使用する際には、各種の治療対象疾患や各種の投与方法が知られている。これらの全ての治療対象疾患や投与方法に適合する製剤の開発が待たれていた。

本発明者らは、上記課題を解決するために、先ず可溶性トロンボモジュリン高濃度製剤の必要性を感じ、これを作成することとした。可溶性トロンボモジュリンを医薬組成物として広く安定的に供給するに際しては凍結乾燥製剤とすることが知られている。凍結乾燥製剤を注射用水などで再溶解し、高濃度の可溶性トロンボモジュリン溶液を作成するに際して、該溶液中に無数の微小な気泡が発生し、且つ気泡の消えが悪く、場合によっては白濁の外観を呈することが、本件発明者らにより始めて確認されたものである。勿論、医療現場で使用する場合、気泡を含有したまま投与することは到底できず、気泡が消えて澄明となるまで放置する時間を無用にとらせ、製剤として品質上問題となる。このような従来全く予想されていなかった問題点を見出し、その解決策を求めて本件発明者らが鋭意検討したところ、可溶性トロンボモジュリン高濃度含有溶液に起泡抑制添加剤として、非イオン性界面活性剤、ベンジルアルコール、クロロブタノールを含有した製剤は、気泡の発生を抑制することを確認し、本件発明を完成するに至った。また、該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤を溶解する際の容器の内壁がシリコーンでコーティングされていること、または該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤を溶解する際の容器内圧力が減圧状態であることも気泡の発生を抑制することを確認し、本件発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、有効成分として可溶性トロンボモジュリンを含有する可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤を溶解して、10 mg/mL 以上の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有溶液を調製するに際し、(a)非イオン性界面活性剤、ベンジルアルコール、クロロブタノールからなる群より選ばれる少なくとも一種

の化合物を存在せしめること、(b)該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤を溶解する際の容器の内壁がシリコーンでコーティングされていること、または(c)該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤を溶解する際の容器内圧力が減圧状態であること、の少なくともいずれかを特徴とする可溶性トロンボモジュリン高濃度含有溶液の起泡抑制方法である。

また、本発明は、有効成分として可溶性トロンボモジュリンを含有する可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤を溶解して、10 mg/mL 以上、好ましくは 20 mg/mL 以上の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有溶液を調製するに際して用いられるものであって、非イオン性界面活性剤、ベンジルアルコール、クロロブタノールからなる群より選ばれる少なくとも一種の化合物を有効成分とする可溶性トロンボモジュリン高濃度含有溶液の起泡抑制剤である。

さらにまた、本発明は、有効成分として可溶性トロンボモジュリンを含有する可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤、または該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤とその溶解用水溶液とを組み合わせしめたキット製剤であって、該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤が 10 mg/mL 以上の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有溶液を調製されるためのものであって、且つ(a)該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤中に、非イオン性界面活性剤、ベンジルアルコール、クロロブタノールからなる群より選ばれる少なくとも一種の化合物が存在せしめられているか、および/または該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤の溶解用水溶液中に、非イオン性界面活性剤、ベンジルアルコール、クロロブタノールからなる群より選ばれる少なくとも一種の化合物が存在せしめられていること、(b)該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤を溶解する際の容器の内壁がシリコーンでコーティングされていること、または(c)該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤を溶解する際の容器内圧力が減圧状態であること、の少なくともいずれかを特徴とする可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤、またはそのキット製剤である。

また、本発明者らは、可溶性トロンボモジュリン高濃度製剤を作成するに際し、従来の技術の問題点を検討した。すなわち、各種の治療対象疾患や各種の投与方法に広く適用可能な可溶性トロンボモジュリンの高濃度製剤の調製においては、

例えば特に筋肉内投与や皮下投与の投与方法に採用できるためには、筋肉内や皮下に対して一定量以上の溶液量を投与することは困難である点が挙げられる。しかも、本発明者らが子細に検討したところ、該投与溶液の浸透圧が低すぎても高過ぎても疼痛が強くなり好ましくないことが確認された。

一方、トロンボモジュリンの凍結乾燥の過程で、可溶性トロンボモジュリン含有溶液を凍結乾燥すると、変性または会合等によって高分子化した多量体が生成することが明らかとなっている。従来、可溶性トロンボモジュリンの変性を防止する方法として、アミノ酸またはその塩類および糖類よりなる群から選ばれた一種または二種以上を添加することが知られている（特開平 6-321805 号公報）。しかしながら、同公報が具体的に開示する添加物やその添加量による組成物は、疼痛等の点において必ずしも好ましくないことが、本発明者らにより確認された。すなわち、特開平 6-321805 号公報の開示する具体的な組成物（例えば実施例 20）は、可溶性トロンボモジュリンを 10 mg 以上含有する可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤とし、皮下や筋肉内投与を念頭において 0.1 mL から 2 mL の溶解用水溶液に溶解した場合、本発明者らの実験によれば疼痛を示すことが確認された。

また、可溶性トロンボモジュリンに、マルトース、ラクトース、蔗糖、アルギニンを添加することも知られているが（W095/16460 号公報）、この W095/16460 号公報中では、マンニトールの添加は可溶性トロンボモジュリンの変性を防止することはできないと記載されているため、当業者には必ずしも好ましい添加物とも考えられていない状況であったが、本件発明者らが鋭意検討したところ、例えば W095/16460 号公報中好ましくないと言われているマンニトールであっても、マンニトールにグルタミン酸またはその塩を共存させると、マンニトールを単独で添加するのに比べて、極めて高い安定性が達成されという顕著な相乗効果が認められ、浸透圧比を適当に調整できる濃度においても好ましい安定性が達成されるという事実を確認し、併せて、皮下や筋肉内投与をした場合でも疼痛が生じがたい製剤となることを確認して、以下の本件発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、有効成分として可溶性トロンボモジュリンを含有する可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤における可溶性トロンボモジュリンの

安定化方法であって、(1) グルタミン酸またはその塩、およびマンニトールの 2 種を含む、(2) グルタミン酸またはその塩、およびリシンまたはその塩の 2 種を含む、(3) グルタミン酸またはその塩、およびアスパラギン酸またはその塩の 2 種を含む、または(4) アスパラギン酸またはその塩、およびマンニトールの 2 種を含む、のいずれかの組み合わせを含有せしめ、且つ該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤が、0.1 mL から 2 mL の溶解用水溶液に溶解し得て、10 mg/mL 以上の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有溶液を調製でき、その溶解時の浸透圧比が 0.5 から 2.0 であることを特徴とする可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤における可溶性トロンボモジュリンの安定化方法である。

発明を実施するための最良の形態

以下に本発明を詳細に説明する。

本発明は、下記に示される起泡抑制方法、または起泡抑制剤である。すなわち、本発明は、有効成分として可溶性トロンボモジュリンを含有する可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤を溶解して、10 mg/mL 以上の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有溶液を調製するに際し、(a)非イオン性界面活性剤、ベンジルアルコール、クロロブタノールからなる群より選ばれる少なくとも一種の化合物を存在せしめること、(b)該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤を溶解する際の容器の内壁がシリコーンでコーティングされていること、または(c)該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤を溶解する際の容器内圧力が減圧状態であること、の少なくともいずれかを特徴とする可溶性トロンボモジュリン高濃度含有溶液の起泡抑制方法である。

該可溶性トロンボモジュリン高濃度含有溶液の起泡抑制手段としては、上記の(a)、(b)、(c)のいずれかが好ましいが、好ましくは(a)であり、さらに(a)且つ(c)や、(a)且つ(b)も好ましい。また(b)且つ(c)も好ましく、(a)且つ(b)且つ(c)が特に好ましい例として挙げられる。

以下先ず、上記の(a)について説明する。

具体的に本発明は、該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤を溶解して、10 mg/mL 以上の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有溶液を調製するに際し、非

イオン性界面活性剤、ベンジルアルコール、クロロブタノールからなる群より選ばれる少なくとも一種の化合物を存在せしめることを特徴とする可溶性トロンボモジュリン高濃度含有溶液の起泡抑制方法である。

また、さらに具体的には、該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤中に、非イオン性界面活性剤、ベンジルアルコール、クロロブタノールからなる群より選ばれる少なくとも一種の化合物が存在せしめられていること、または、該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤を溶解するための溶解用水溶液中に、非イオン性界面活性剤、ベンジルアルコール、クロロブタノールからなる群より選ばれる少なくとも一種の化合物が存在せしめられていること、のいずれかを特徴とする可溶性トロンボモジュリン高濃度含有溶液の起泡抑制方法である。

本発明で可溶性トロンボモジュリンとしては、トロンビンに結合し、トロンビンによるプロテインCの活性化を促進する作用を有し、界面活性剤の非存在下でも容易に溶解し得る物質であれば、特に限定されない。また可溶性トロンボモジュリンには、その他に、トロンビンによる凝固時間を延長する作用、および/またはトロンビンによる血小板凝集を抑制する作用が通常認められると、当業者は理解する。可溶性トロンボモジュリンの溶解性の好ましい例示としては、水、例えば注射用蒸留水に対して（トリトン X-100 やポリドカノール等の界面活性剤の非存在下、通常は中性付近にて）、1 mg/mL 以上、または 10 mg/mL 以上が挙げられ、好ましくは 15 mg/mL 以上、または 17 mg/mL 以上が挙げられ、さらに好ましくは 20 mg/mL 以上、25 mg/mL 以上、または 30 mg/mL 以上が例示され、特に好ましくは 60 mg/mL 以上が挙げられ、場合によっては、80 mg/mL 以上、または 100 mg/mL 以上がそれぞれ挙げられる。可溶性トロンボモジュリンが溶解し得たか否かを判断するに当たっては、溶解した後に、例えば白色光源の直下、約 1000 ルックスの明るさの位置で、肉眼で観察した場合に、澄明であって、明らかに認められるような程度の不溶性物質を含まないことが端的な指標となるものと理解される。また、濾過して残渣の有無を確認することもできる。この溶解についての判断は、後述する起泡抑制添加剤や安定化添加剤やその他の添加剤等を含めて溶解する確認方法としても利用できる。

また、トロンビンによるプロテインCの活性化を促進する作用は、例えば、特

開昭 64-6219 号公報を初めとする各種の公知文献に明確に記載された試験方法によりプロテインCの活性化を促進する作用の活性量やその有無を容易に確認できるものである。また、トロンビンによる凝固時間を延長する作用、および／またはトロンビンによる血小板凝集を抑制する作用についても同様に容易に確認できる。可溶性トロンボモジュリンとしては、ヒト尿等を原料とするヒト由来のペプチドや、ヒト由来の遺伝子や DNA 等からの変異、または誘導体が好ましい例として挙げられ、例えば、配列表配列番号 3 の 19-132 のアミノ酸配列を該ペプチド中に包含していることが好ましく、この場合に、勿論、前述の通り、可溶性トロンボモジュリンであるとの性質が必要となる。この配列表配列番号 3 の 19-132 のアミノ酸配列は、トロンビンによるプロテインCの活性化を促進する作用等を有する限り自然または人工的に変異していてもよく、すなわち配列表配列番号 3 の 19-132 のアミノ酸配列の 1 つ以上、すなわち 1 つまたは複数のアミノ酸、さらに好ましくは数個のアミノ酸配列が置換、欠失、付加していても良い。例えば配列表配列番号 7 の 19-132 のアミノ酸配列、すなわち配列表配列番号 3 のアミノ酸配列中の 125 位の Val が Ala に置換された配列からなるペプチド、またはそれらを包含するペプチドも本発明に用いることができる。許容される変異の程度は、活性を有する限り特に限定されないが、例えばアミノ酸配列として、50%以上、好ましくは 70%以上、特に好ましくは 80%以上、さらに好ましくは 90%以上または 95%以上、さらには 98%以上の相同性が例示される。後述の通り、これらの変異については通常の遺伝子操作技術を用いれば容易に取得可能である。

また、本発明に用いることのできる可溶性トロンボモジュリンとしては、例えば、配列表配列番号 1 のアミノ酸配列をコードする DNA をベクターにより宿主細胞にトランスフェクトして調製された形質転換細胞より取得されるペプチドが挙げられる。この形質転換細胞により取得されるペプチドとしては、配列表配列番号 1 の 19-516 位のアミノ酸配列からなるペプチドが好ましい例として挙げられる。また上述の通り、この配列表配列番号 1 の 19-516 のアミノ酸配列は、トロンビンによるプロテインCの活性化を促進する作用を有する限り自然または人工的に変異していてもよく、すなわち配列表配列番号 1 の 19-516 のアミノ酸配列の 1 つ以上、すなわち 1 つまたは複数のアミノ酸、さらに好ましくは数個のアミ

ノ酸が置換、欠失、付加していても良い。例えば配列表配列番号 5 の 19-516 のアミノ酸配列、すなわち配列表配列番号 1 のアミノ酸配列中の 473 位の Val が Ala に置換された配列からなるペプチドも本発明に用いることができる。その他に宿主細胞によっては、シグナル部分がそのままのものや、前記配列表配列番号 1、又は配列番号 5 の 17-516 位のアミノ酸配列のそれぞれからなるペプチド、またはそれらの混合物等が産生され、それらのいずれであってもよい。勿論これらのペプチドは極めて溶解性が高く、前述の溶解性を十分に有するものである。本発明において、上記の配列表配列番号 1 の 19-516 位、又は 17-516 位のそれぞれのアミノ酸配列からなるペプチドは特に好ましい。

また、可溶性トロンボモジュリンが、配列表配列番号 4 または 8 の 55-396 の塩基配列の相補 DNA に対してストリンジेंटな条件下にてハイブリダイズできる DNA によりコードされるペプチドであり、トロンビンのプロテイン C の活性化を促進する作用を有し、且つ界面活性剤の非存在下で溶解し得ることのできることも好ましい。ストリンジेंटな条件とは、相補 DNA が目的の DNA と特異的にハイブリダイズできる条件であって、例えば、相補 DNA に DNA、RNA、合成 DNA を用いてハイブリダイズさせ、その後、非特異的に目的の DNA 以外にハイブリダイズした相補 DNA を洗い流す条件を言う。例えば、Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning, 第 2 版、Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) を参考にして決定すればよい。例えば、42°C で、6 × SSC、5 × Denhardt's reagent、0.5% SDS、100 μg/mL denatured, fragmented salmon sperm DNA、50%ホルムアミド中ハイブリダイズせしめ、68°C で、0.1 × SSC、0.5% SDS にて洗浄してもハイブリダイズするものが挙げられる。

さらに、これらのペプチドは、前記のアミノ酸配列を有すればよいのであって、糖鎖が付いていても、又付いていなくともよく、この点は特に限定されるものではない。また遺伝子操作においては、使用する宿主細胞の種類により、糖鎖の種類や、付加位置や付加の程度は相違するものであり、いずれも用いることができる。後述の通り、遺伝子操作により取得することに特定されるものではないが、遺伝子操作により取得する場合には、発現に際して用いることができるシグナル配列としては、上述の配列表配列番号 1 の 1-18 のアミノ酸配列からなる塩基配

列、その他公知のシグナル配列、例えば、ヒト組織プラスミノゲン活性化因子 (tPA) のシグナル配列を利用することができる (国際公開 88/9811 号公報参照のこと)。

可溶性トロンボモジュリンをコードする DNA 配列を宿主細胞へ導入する場合には、好ましくは可溶性トロンボモジュリンをコードする DNA 配列を、ベクター、特に好ましくは、動物細胞において発現可能な発現ベクターに組み込んで導入する方法が挙げられる。発現ベクターとは、プロモーター配列、mRNA にリボソーム結合部位を付与する配列、発現したい蛋白をコードする DNA 配列、スプライシングシグナル、転写終結のターミネーター配列、複製起源配列などで構成される DNA 分子であり、好ましい動物細胞発現ベクターの例としては、R. C. Mulligan ら [Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78, 2072(1981)] が報告している pSV2-X や、P. M. Howley ら [Method in Enzymology, 101, 387, Academic Press(1983)] が報告している pBP69 T (69-6) などが挙げられる。

これらのペプチドを製造するに際して用いることのできる宿主細胞としては、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞、COS-1 細胞、COS-7 細胞、VERO (ATCC CCL-81) 細胞、BHK 細胞、イヌ腎由来 MDCK 細胞、ハムスター AV-12-664 細胞等が、またヒト由来細胞として HeLa 細胞、WI38 細胞、ヒト 293 細胞等が挙げられる。CHO 細胞においては、DHFR-CHO 細胞がさらに好ましい。

また、遺伝子操作の過程やペプチドの製造過程において、大腸菌等の微生物も多く使われ、それぞれに適した宿主ベクター系を使用することが好ましく、上述の宿主細胞においても、適宜のベクター系を選択することができる。遺伝子組換え技術に用いる可溶性トロンボモジュリンの遺伝子は、クローニングされており、そして可溶性トロンボモジュリンの遺伝子組換え技術を用いた製造例が開示されており、さらにはその精製品を得るための精製方法も知られている [特開昭 64-6219 号公報、特開平 2-255699 号公報、特開平 5-213998 号公報、特開平 5-310787 号公報、特開平 7-155176 号公報、J. Biol. Chem., 264:10351-10353(1989)]。したがって本発明の可溶性トロンボモジュリンは、上記の報告に記載されている方法を用いることにより、あるいはそれらに記載の方法に準じることにより製造することができる。例えば特開昭 64-6219 号公報では、全長のト

ロンボモジュリンをコードする DNA を含むプラスミド pSV2TMJ2 を含む、*Escherichia coli* K-12 strain DH5(ATCC 寄託番号 67283 号)が開示されている。また、この菌株を生命研（現独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター）に再寄託した菌株(*Escherichia coli* DH5/pSV2TM J2) (FERMBP-5570) を用いることもできる。この全長のトロンボモジュリンをコードする DNA を原料として、公知の遺伝子操作技術によって、本発明の可溶性トロンボモジュリンを調製することができる。

本発明に用いられる可溶性トロンボモジュリンは、従来公知の方法またはそれに準じて調製すればよいが、例えば、前記山本らの方法〔特開昭 64-6219 号公報〕、または特開平 5-213998 号公報を参考にすることができる。すなわちヒト由来の可溶性トロンボモジュリン遺伝子を遺伝子操作技術により、例えば、配列表配列番号 1 のアミノ酸配列をコードする DNA となし、さらに必要に応じた改変を行うことも可能である。この改変としては、メソッド イン エンザイモロジー [Method in Enzymology, 100:468(1983 年), アカデミックプレス (Academic Press)] に記載の方法に従って、部位特異的変異を行う。例えば、配列表配列番号 2 の第 1418 位の塩基 T は、変異用合成 DNA を用いて塩基 C に変換した DNA となすことができる。

このようにして調製した DNA を、例えばチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞に組み込んで、形質転換細胞とし、適宜選択し、この細胞を培養して得た培養液から、公知の方法により精製された可溶性トロンボモジュリンが製造できる。前述の通り配列表配列番号 1 のアミノ酸配列をコードする DNA を前記宿主細胞にトランスフェクトすることが好ましい。本発明に用いられる可溶性トロンボモジュリンの生産方法は、上記の方法に限定されるものではなく、例えば、尿や血液、その他体液等から抽出精製することでも可能であるし、また可溶性トロンボモジュリンを生産する組織またはこれら組織培養液等から抽出精製することも、また必要によりさらに蛋白分解酵素により切断処理することも可能である。

次いで上記により取得された培養上清、または培養物からの可溶性トロンボモジュリンの単離精製方法は、公知の手法〔堀尾武一編集、蛋白質・酵素の基礎実験法〕に準じて行なうことができる。例えば、可溶性トロンボモジュリンと逆の

電荷を持つ官能基を固定化したクロマトグラフィー担体と、可溶性トロンボモジュリンの間の相互作用を利用したイオン交換クロマトグラフィーや吸着クロマトグラフィーの使用も好ましい。また、可溶性トロンボモジュリンとの特異的親和性を利用したアフィニティークロマトグラフィーも好ましい例として挙げられる。吸着体の好ましい例として、可溶性トロンボモジュリンのリガンドであるトロンビンや可溶性トロンボモジュリンの抗体を利用する例が挙げられる。これらの抗体としては、適宜の性質、或いは適宜のエピトープを認識する可溶性トロンボモジュリンの抗体を利用することができ、例えば、特公平 5-42920 号公報、特開昭 64-45398 号公報、特開平 6-205692 号公報などに記載された例が挙げられる。また、可溶性トロンボモジュリンの分子量サイズを利用した、ゲル濾過クロマトグラフィーや限外濾過が挙げられる。そしてまた、疎水性基を固定化したクロマトグラフィー担体と、可溶性トロンボモジュリンのもつ疎水性部位との間の疎水結合を利用した疎水性クロマトグラフィーが挙げられる。また、吸着クロマトグラフィーとしてハイドロキシアパタイトを担体として用いることも可能であり、例えば、特開平 9-110900 号公報に記載した例が挙げられる。これらの手法は適宜組み合わせることができる。精製の程度は、使用目的等により選択できるが、例えば電気泳動、好ましくは SDS-PAGE の結果が単一バンドとして得られるか、もしくは単離精製品のゲル濾過 HPLC または逆相 HPLC の結果が単一のピークになるまで純粋化することが望ましい。

もちろん、複数種の可溶性トロンボモジュリンを用いる場合には、実質的に可溶性トロンボモジュリンのみのバンドになることが好ましいのであり、単一のバンドになることを求めるものではない。

本発明における精製法を具体的に例示すれば、可溶性トロンボモジュリン活性を指標に精製する法が挙げられ、例えばイオン交換カラムの Q-セファロース Fast Flow で培養上清または培養物を粗精製し可溶性トロンボモジュリン活性を有する画分を回収し、ついでアフィニティークラムの DIP-トロンビン-アガロース (diisopropylphosphorylthrombin agarose) カラムで主精製し可溶性トロンボモジュリン活性が強い画分を回収し、回収画分を濃縮し、ゲルろ過にかけ可溶性トロンボモジュリン活性画分を純品として取得する精製方法[Gomi K. ら、Blood、

75:1396-1399 (1990)]が挙げられる。指標とする可溶性トロンボモジュリン活性としては、例えばトロンビンによるプロテインC活性化の促進活性が挙げられる。その他に、好ましい精製法を例示すると以下の通りである。

可溶性トロンボモジュリンと良好な吸着条件を有する適当なイオン交換樹脂を選定し、イオン交換クロマト精製を行なう。特に好ましい例としては、0.18 M NaCl を含む 0.02 M トリス塩酸緩衝液 (pH7.4) で平衡化した Q-セファロース Fast Flow を用いる方法である。適宜洗浄後、例えば 0.3M NaCl 含む 0.02 M トリス塩酸緩衝液 (pH7.4) で溶出し粗精製品の可溶性トロンボモジュリンを得ることができる。

次に、例えば可溶性トロンボモジュリンと特異的親和性を持つ物質を樹脂に固定化しアフィニティークロマト精製を行なうことができる。好ましい例として DIP-トロンビン-アガロースカラムの例と、抗可溶性トロンボモジュリンモノクローナル抗体カラムの例が挙げられる。DIP-トロンビン-アガロースカラムは、予め、例えば、100 mM NaCl および 0.5 mM 塩化カルシウムを含む 20 mM トリス塩酸緩衝液 (pH7.4) で平衡化せしめ、上記の粗精製品をチャージして、適宜の洗浄を行い、例えば、1.0 M NaCl 及び 0.5 mM 塩化カルシウムを含む 20 mM トリス塩酸緩衝液 (pH7.4) で溶出し精製品の可溶性トロンボモジュリンを取得することができる。また抗可溶性トロンボモジュリンモノクローナル抗体カラムにおいては、予め CNBr により活性化したセファロース 4FF (ファルマシア社) に、抗可溶性トロンボモジュリンモノクローナル抗体を溶解した 0.5 M NaCl 含有 0.1 M NaHCO₃ 緩衝液 (pH8.3) に接触させ、セファロース 4FF に抗可溶性トロンボモジュリンモノクローナル抗体をカップリングさせた樹脂を充填したカラムを、予め例えば 0.3 M NaCl 含む 20 mM リン酸塩緩衝液 (pH7.3) で平衡化し、適宜の洗浄の後、例えば、0.3 M NaCl 含む 100 mM グリシン塩酸緩衝液 (pH3.0) にて溶出せしめる方法が例示される。溶出液は適当な緩衝液で中和し、精製品として取得することもできる。

次に得られた精製品を pH3.5 に調整した後に、0.3 M NaCl を含む 100 mM グリシン塩酸緩衝液 (pH3.5) で平衡化した陽イオン交換体、好ましくは強陽イオン交換体である SP-セファロース FF (ファルマシア社) にチャージし、同緩衝液で洗

浄して得られた非吸着画分を得る。得られた画分は適当な緩衝液で中和し、高純度精製品として取得することができる。これらは、限外濾過により濃縮することが好ましい。

さらに、ゲル濾過による緩衝液交換を行なうことも好ましい。例えば、50 mM NaCl を含む 20 mM リン酸塩緩衝液 (pH7.3) で平衡化せしめた Sephacryl S-300 カラムもしくは S-200 カラムに、限外濾過により濃縮した高純度精製品をチャージし、50 mM NaCl を含む 20 mM リン酸塩緩衝液 (pH7.3) で展開分画し、トロンビンによるプロテインCの活性化の促進活性の確認を行ない活性画分を回収し緩衝液交換した高純度精製品を取得することができる。このようにして得られた高純度精製品は安全性を高めるために適当なウイルス除去膜、例えばプラノバ15N (旭化成株式会社) を用いてろ過することが好ましく、その後限外濾過により目的の濃度まで濃縮することができる。最後に無菌濾過膜により濾過することが好ましい。

本発明の起泡抑制としては、可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤を溶解用水溶液で溶解して、可溶性トロンボモジュリン高濃度含有溶液を得る際に、溶液中に発生する気泡を抑制することと通常理解される。本発明の起泡抑制方法により、気泡の発生がほぼ完全に防止されることが、勿論最も好ましいことではあるが、起泡抑制のための方策を行わなかった場合に比較して、本発明の起泡抑制を行った場合に、起泡の程度が改善されている場合には、起泡抑制効果があると理解される。

起泡抑制の程度を知る方法としては、目視で濁り度合いを観察する方法があるが、例えば、以下の方法により、気泡の発生程度を濁度として波長 650 nm の透過率を測定することにより調べることができる。例えば、測定試料となる凍結乾燥製剤 (例えば 3 mL バイアル瓶 (18×33 mm、口内径 9.1 mm、ナミコス製)、ゴム栓 (V5-F8、大協精工製)) のゴム栓中央に、溶解用水溶液 (例えば日本薬局方注射用水、大塚製薬工場製) 1 mL を吸引した注射用シリンジ (ツベルクリン用 1 mL、注射針:26G 0.45×13 mm、テルモ製) を刺し、0.1 mL/秒の速度で溶解用水溶液を凍結乾燥物中央に注入する。注射用シリンジを刺したまま静置して溶解させる。注入終了の 30 秒後にバイアル瓶を逆さまにしてシリンジで凍乾物溶解液

を約 0.8 mL 吸引する。この吸引した溶解液を石英セル（ブラックセル、光路長:10 mm、光路幅:2 mm、ジーエルサイエンス製）にセル壁を伝わらせて静かに注ぐ。素早く紫外可視分光光度計（UV-2500PC、島津製作所製）を用いて、650 nm の透過率（事前に溶解用水溶液のみで 650 nm における透過率 100%を調整しておく）を測定すればよい。測定の正確性を期するためには、溶解用水溶液を注入してから透過率を測定するまでの時間を一定とすべきであり、例えば凍乾物溶解液をバイアル瓶から吸引して透過率を測定するまでの時間は 15 秒程度とすることが好ましい例として挙げられる。起泡抑制の程度としては、目視で観察した場合、白濁して見えるほど気泡が発生していないことが通例好ましく、目視では気泡が確認できないことがさらに好ましい。さらに上記の機器を用いて濁度を測定する方法の場合、溶液の透過率が 95%以上が好ましく、97%以上がさらに好ましく、特に好ましくは 98%以上、最も好ましくは 99%以上が挙げられる。

本発明の可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤を溶解して得られる可溶性トロンボモジュリン高濃度含有溶液において、可溶性トロンボモジュリン濃度の上限としては、溶解し得る濃度以下であれば特に制限は無いが、例えば、通常 100 mg/mL 以下、または 80 mg/mL 以下であり、好ましくは 60 mg/mL 以下、又は 50 mg/mL 以下、さらに好ましくは 40 mg/mL 以下が挙げられ、特に好ましくは 30 mg/mL 以下が挙げられる。可溶性トロンボモジュリン濃度の下限としては 10 mg/mL 以上、又は 13 mg/mL 以上が好ましく、15 mg/mL 以上、又は 16 mg/mL 以上がさらに好ましい。17 mg/mL 以上がさらに好ましく、20 mg/mL 以上が特に好ましい。また 25 mg/mL 以上も好ましく、特に約 30 mg/mL、またはそれ以上が好ましい例として挙げられる。なお、起泡抑制の効果を求める場合には、起泡の問題が生ずる濃度であることが好ましい。

本発明の起泡を抑制する添加剤（以下、起泡抑制添加剤と言うことがある）として挙げた非イオン性界面活性剤は、医薬品の添加剤として利用可能なものであることが好ましいが、特に限定されるものではない。本発明の非イオン性界面活性剤を構造から分類すると例えば、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンーポリオキシプロピレン共重合体、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレン硬

化ヒマシ油などが好ましい種類として挙げられる。

ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステルとしては、例えばモノラウレート (Polysorbate 20)、モノパルミテート (Polysorbate 40)、モノステアレート (Polysorbate 60)、トリステアレート、イソステアレート、モノオレート (Polysorbate 80)、トリオレートなどが例示されるが、好ましくは Polysorbate 20、Polysorbate 40、Polysorbate 60、Polysorbate 80 などであり、特に好ましくは Polysorbate 80 が挙げられる。

また、ポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレン共重合体としては、プロピレンオキサイドとエチレンオキサイドの重合度はそれぞれ任意であって特に制限は無いが、好ましくは Poloxamer 124、Poloxamer 188、Poloxamer 237、Poloxamer 338、Poloxamer 407 などが例示され、特に好ましくは Poloxamer 188、ポリオキシエチレン (160) ポリオキシプロピレン (30) グリコールが挙げられる。

また、ポリオキシエチレンアルキルエーテルとしては、例えば高級アルコール部がラウリルアルコール、ミリスチルアルコール、セチルアルコール、ステアリルアルコールなどが挙げられ、酸化エチレンの重合度は任意であるが、ラウロマクロゴール (ポリオキシエチレンラウリルエーテル) が好ましく、酸化エチレンの付加モル数が 9、21、25 のものなどがさらに好ましい。

また、ポリオキシエチレン脂肪酸エステルとしては、例えばモノラウレート、ジラウレート、モノステアレート、ジステアレート、モノオレート、ジオレートなどが例示されるが、ポリオキシエチレンモノステアレートが好ましく、酸化エチレンの付加モル数により Polyoxyl 12 stearate、Polyoxyl 20 stearate、Polyoxyl 40 stearate、Polyoxyl 50 stearate、Polyoxyl 100 stearate などがさらに好ましく、Polyoxyl 40 stearate が特に好ましい。

また、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油としては、酸化エチレンの付加モル数により Polyoxyl 20 hydrogenated castor oil、Polyoxyl 30 hydrogenated castor oil、Polyoxyl 40 hydrogenated castor oil、Polyoxyl 50 hydrogenated castor oil (ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油 60 と記載することもある)、Polyoxyl 60 hydrogenated castor oil、Polyoxyl 80 hydrogenated

castor oil、Polyoxyl 100 hydrogenated castor oil、などが好ましく、Polyoxyl 60 hydrogenated castor oil(以下 HCO-60 という表現をする場合もある。ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油 60 という事もある)が特に好ましい。これらの非イオン性界面活性剤を用いる場合は、1種類あるいは2種類以上を混合して用いることができるし、さらにベンジルアルコールやクロロブタノールと混合して用いることもできる。

本発明の可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤中、または該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤を溶解するための溶解用水溶液中に添加される起泡抑制添加剤の添加量は、起泡を抑制できる量であれば特に制限されるものではないが、可溶性トロンボモジュリンの濃度や、その他の添加剤の含有量により適宜判断すればよく、さらに、後述する(b)該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤を溶解する際の容器の内壁がシリコーンでコーティングされていること、または(c)該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤を溶解する際の容器内圧力が減圧状態であること、等の処置の有無によっても変化し得るので、例えば、上記の気泡の発生程度を波長 650 nm の透過率を測定する方法において、例えば 95%以上の透過率を示すようになる添加量を予め測定して添加量を決定することが好ましい。一例としては、起泡抑制添加剤の内、非イオン性界面活性剤の添加量は、有効成分として可溶性トロンボモジュリンを含有する可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤を溶解して、10 mg/mL の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有溶液を調製するに際しては、この溶液中に存在する非イオン性界面活性剤の添加量の下限としては、例えば 0.001 mg 以上が好ましく、より好ましくは 0.005 mg 以上、さらに好ましくは 0.01 mg 以上、場合によっては 0.05 mg 以上、または 0.1 mg 以上、さらには 0.5 mg 以上である例が挙げられる。非イオン性界面活性剤の上限としては通常 10 mg 以下であり、好ましくは 5 mg 以下、さらに好ましくは 1 mg 以下、場合によっては 0.5 mg 以下が挙げられる。また、30 mg/mL の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有溶液を調製するに際しては、この溶液中に存在する非イオン性界面活性剤の添加量の下限としては、例えば 0.003 mg 以上が好ましく、より好ましくは 0.015 mg 以上、さらに好ましくは 0.03 mg 以上、場合によっては 0.15 mg 以上、または 0.3 mg 以上、さらには 1.5

mg 以上である例が挙げられる。非イオン性界面活性剤の上限としては、例えば通常 30 mg 以下であり、好ましくは 15 mg 以下、さらに好ましくは 3 mg 以下、場合によっては 1.5 mg 以下が挙げられる。さらに、17, 20, 25 mg/mL 等やそれら以外の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有溶液を調製するに際しては、実際に添加量を測定することが好ましいが、例えば 10 mg/mL と 30 mg/mL の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有溶液中に存在する非イオン性界面活性剤の上記の添加量の例示を参考に、可溶性トロンボモジュリンの濃度に基づいて等比等の計算にて求めることも好ましい。

また、複数の非イオン性界面活性剤を添加する場合にも、波長 650 nm の透過率を測定する方法において、95%以上の透過率を示すような添加量を調べる等の方法により決定することができる。通常は、複数の非イオン性界面活性剤の合計量が、上記に例示された添加量とすることが簡便であろうし、若干濃い目に添加することも好ましい。

本発明の可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤中、または該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤を溶解するための溶解用水溶液中に添加される起泡抑制添加剤の内、ベンジルアルコール、クロロブタノール、または両物質を混合した時の添加量は、起泡を抑制できる量であれば特に制限されるものではないが、可溶性トロンボモジュリンおよびその他の添加剤の含有量により適量添加することができる。なお、ベンジルアルコール、クロロブタノールを使用して起泡抑制効果を発揮せしめるに際しては、溶解用水溶液中に、これらの化合物を添加することが好ましい。これらの添加量を検討する方法は、上述した通り、例えば、上記の波長 650 nm の透過率を測定し、95%以上の透過率を示すような添加量を調べる方法が好ましい。具体的な一例としては、例えば、該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤を溶解して、10 mg/mL の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有溶液を調製するに際しては、この溶液中に存在するベンジルアルコール、クロロブタノール、または両物質を混合した時の添加量の下限としては、例えば 0.01 mg 以上が好ましく、より好ましくは 0.05 mg 以上、さらに好ましくは 0.1 mg 以上、場合によっては 0.5 mg 以上、または 1 mg 以上、さらには 5 mg 以上である例が挙げられる。上限としては、例えば通常 100 mg 以下であり、好ましく

は 50 mg 以下、さらに好ましくは 10 mg 以下、場合によっては 5 mg 以下が挙げられる。また、30 mg/mL の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有溶液を調製するに際しては、この溶液中に存在するベンジルアルコール、クロロブタノール、または両物質を混合した時の添加量の下限としては、例えば 0.03 mg 以上が好ましく、より好ましくは 0.15 mg 以上、さらに好ましくは 0.3 mg 以上、場合によっては 1.5 mg 以上、または 3 mg 以上、さらには 15 mg 以上である例が挙げられる。上限としては、通常 300 mg 以下であり、好ましくは 150 mg 以下、さらに好ましくは 30 mg 以下、場合によっては 15 mg 以下が挙げられる。さらに、上記以外の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有溶液を調製するに際しては、例えば 10 mg/mL や 30 mg/mL の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有溶液中に存在するベンジルアルコール、クロロブタノール等の上記の添加量の例示を参考に可溶性トロンボモジュリンの濃度に基づいて等比で計算にて求めることも好ましい例として挙げられる。

本発明における溶解用水溶液としては、特に限定されないが、例えば蒸留水（または注射用水）、生理食塩液、ブドウ糖注射液、キシリトール注射液などが挙げられ、蒸留水が好ましい例として挙げられる。さらに、該溶解用水溶液中に、非イオン性界面活性剤、ベンジルアルコール、クロロブタノールからなる群より選ばれる少なくとも一種の化合物が存在せしめることも好ましい。上記の凍結乾燥製剤中に非イオン性界面活性剤、ベンジルアルコール、クロロブタノールからなる群より選ばれる少なくとも一種の化合物を含む場合には、溶解用水溶液としては、蒸留水、生理食塩液、またはブドウ糖注射液などを使用することが出来、またさらに非イオン性界面活性剤、ベンジルアルコール、クロロブタノールからなる群より選ばれる少なくとも一種の化合物を含んでいてもよい。通常、上記凍結乾燥製剤中には、ベンジルアルコール、クロロブタノールではなく、非イオン性界面活性剤が含有されることが凍結乾燥製剤においては好ましい。上記凍結乾燥製剤中に非イオン性界面活性剤、ベンジルアルコール、クロロブタノールを含まない場合は、溶解用水溶液には、非イオン性界面活性剤、ベンジルアルコール、クロロブタノールからなる群より選ばれる少なくとも一種の化合物を含ませることにより、起泡抑制作用を発揮させることが出来、その場合も好ましい。なお、

溶解用水溶液中に起泡抑制添加剤を添加する場合の起泡抑制添加剤の添加量は、起泡抑制効果が有効に発揮するのであれば特に制限されるものではないが、可溶性トロンボモジュリン高濃度含有溶液の可溶性トロンボモジュリン濃度に対する添加量として上記に例示した量が好ましい。

溶解用水溶液に非イオン性界面活性剤を添加する際の添加量は、起泡抑制効果が有効に発揮するのであれば特に制限されるものではなく、前述の通り測定することにより適宜決定すればよいが、簡便のために、通常可溶性トロンボモジュリン濃度等の条件において目安となる溶解用水溶液中の非イオン性界面活性剤、ベンジルアルコール、またはクロロブタノールの添加量を提示すると以下が例示される。すなわち、非イオン性界面活性剤においては、通常添加量の上限としては、例えば蒸留水 1 mL に対して、通常 100 mg 以下、または 50 mg 以下、好ましくは 30 mg 以下、又は 10 mg 以下、特に好ましくは 1 mg 以下が挙げられる。下限としては 0.001 mg 以上、好ましくは 0.01 mg 以上、さらに好ましくは 0.03 mg 以上、特に好ましくは 0.05 mg 以上、または 0.1 mg 以上が例示される。ベンジルアルコールの添加量は、例えば蒸留水 1 mL に対しての添加量の上限としては、通常、50 mg 以下、又は 40 mg 以下、好ましくは 30 mg 以下、さらに好ましくは 20 mg 以下、又は 10 mg 以下が挙げられる。下限としては 0.1 mg 以上、又は 1 mg 以上、好ましくは 4 mg 以上、又は 5 mg 以上、さらに好ましくは 7 mg 以上、特に好ましくは 10 mg 以上が例示される。また、クロロブタノールの添加量は、例えば蒸留水 1 mL に対しての添加量の上限としては、通常、20 mg 以下、又は 15 mg 以下、好ましくは 10 mg 以下、又は 8 mg 以下、さらに好ましくは 7 mg 以下、又は 5 mg 以下が挙げられる。下限としては通常、0.1 mg 以上、又は 1 mg 以上、好ましくは 2 mg 以上、さらに好ましくは 3 mg 以上、特に好ましくは 5 mg 以上が例示される。

また、溶解用水溶液の容量は、少量から大量まで特に限定されないが、皮下注射や筋肉内注射を考慮したときには、通常、0.1 mL 以上、好ましくは 0.3 mL 以上、さらに好ましくは 0.5 mL 以上が例示される。また、その容量の上限としては、通常 10 mL 以下、好ましくは 5 mL 以下、さらに好ましくは 3 mL 以下、特に好ましくは 2 mL 以下、または 1.5 mL 以下が例示される。さらに、その容量は、

通常は、約 0.5 mL から約 1 mL であることが特に好ましい。

浸透圧比としては、製剤の投与時に疼痛を感じないことが望ましいが、通例 0.5 以上が好ましく、さらに好ましくは 0.8 以上が挙げられる。上限としては、2.0 以下が好ましく、さらに好ましくは 1.5 以下、特に好ましくは 1.2 以下が挙げられる。

本発明の起泡抑制方法、およびその効果を達成するためには、可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤、またはそのキット製剤において、前述した可溶性トロンボモジュリンと起泡抑制添加剤の他の組成は、起泡抑制に特別に障害とならない限り、特に限定されず、例えば、アルギニンを始めとする各種のアミノ酸またはその塩や、マンニトール、トレハロース等の糖類、さらには尿素が添加されていてもよく、その他の通常用いられる添加物を添加することができる。またさらに、それらの組成物を含有させず、可溶性トロンボモジュリンのみの凍結乾燥製剤、または可溶性トロンボモジュリンと起泡抑制添加剤とからなる凍結乾燥製剤であってもよい。しかし、後述の(1) グルタミン酸またはその塩、およびマンニトールの 2 種を含む、(2) グルタミン酸またはその塩、およびリシンまたはその塩の 2 種を含む、(3) グルタミン酸またはその塩、およびアスパラギン酸またはその塩の 2 種を含む、または(4) アスパラギン酸またはその塩、およびマンニトールの 2 種を含む、のいずれかの組み合わせを含有せしめた可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤は安定性も好ましく、最適である。その他に、アルギニン、トレハロースまたは尿素の組成も好ましい例として挙げられる。

すなわち、本発明は、該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤が、(1) グルタミン酸またはその塩、およびマンニトールの 2 種を含む、(2) グルタミン酸またはその塩、およびリシンまたはその塩の 2 種を含む、(3) グルタミン酸またはその塩、およびアスパラギン酸またはその塩の 2 種を含む、または(4) アスパラギン酸またはその塩、およびマンニトールの 2 種を含む、のいずれかの組み合わせを含有せしめられており、さらに該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤中に、非イオン性界面活性剤、ベンジルアルコール、クロロブタノールからなる群より選ばれる少なくとも一種の化合物が存在せしめられているか、および/または該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤を溶解するための溶解

用水溶液中に、非イオン性界面活性剤、ベンジルアルコール、クロロブタノールからなる群より選ばれる少なくとも一種の化合物が存在せしめられていることを特徴とする可溶性トロンボモジュリン高濃度含有溶液の起泡抑制方法である。なお、該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤が、0.1 mL から 2 mL の溶解用水溶液に溶解し得て、10 mg/mL 以上の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有溶液を調製でき、その溶解時の浸透圧比が 0.5 から 2.0 であることが好ましい。

また本発明は、該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤が、(1) 尿素、または(2) 尿素およびアミノ酸、のいずれかを含有せしめられており、さらに該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤中に、非イオン性界面活性剤、ベンジルアルコール、クロロブタノールからなる群より選ばれる少なくとも一種の化合物が存在せしめられているか、および／または該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤を溶解するための溶解用水溶液中に、非イオン性界面活性剤、ベンジルアルコール、クロロブタノールからなる群より選ばれる少なくとも一種の化合物が存在せしめられていることを特徴とする可溶性トロンボモジュリン高濃度含有溶液の起泡抑制方法である。なお、該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤が、0.1 mL から 2 mL の溶解用水溶液に溶解し得て、10 mg/mL 以上の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有溶液を調製でき、その溶解時の浸透圧比が 0.5 から 2.0 であることが好ましい。

さらに本発明は、該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤が、アルギニン、グルタミン酸、プロリン、セリン、グリシン、ヒスチジン、アスパラギン、リジン、フェニルアラニンおよびバリン、およびそれらの塩、トレハロース、ラクトース、スクロースからなる群より選ばれた一種または二種を含有せしめられており、さらに該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤中に、非イオン性界面活性剤、ベンジルアルコール、クロロブタノールからなる群より選ばれる少なくとも一種の化合物が存在せしめられているか、および／または該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤を溶解するための溶解用水溶液中に、非イオン性界面活性剤、ベンジルアルコール、クロロブタノールからなる群より選ばれる少なくとも一種の化合物が存在せしめられていることを特徴とする可溶性トロンボモジュリン高濃度含有溶液の起泡抑制方法である。

なお、本発明においては、起泡抑制添加剤が含有された可溶性トロンボモジュリン高濃度含有溶液は、溶解時の起泡抑制だけでなく、振とうに対する消泡の効果も期待され、特にベンジルアルコールやクロブタノールを含有せしめることが好ましい。

次いで、(b)該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤を溶解する際の容器の内壁がシリコンでコーティングされていること、について説明する。

すなわち、本発明の起泡抑制方法においては、該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤を溶解する際の容器の内壁がシリコンでコーティングされていることが好ましい。

本発明における該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤を溶解する際の容器としては、医薬品の容器として使用可能なもので無菌充填することに適した材料、形状であれば特に限定されないが、該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤を封入するのに適した容器であることが好ましく、通常は、該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤を封入した容器を、溶解する際にもそのまま使用することが好ましい。本発明における該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤を溶解する際の容器の材質としては、例えばガラス又はポリプロピレン、ポリエチレン、環状ポリオレフィン、環状ポリオレフィンと α オレフィンの共重合体、ポリエチレンテレフタレート、ポリスチレン、ABS樹脂、ポリエステル、ポリ塩化ビニル、ナイロン、ポリテトラフルオロエチレン、ポリメチルペンテン、6フッ化樹脂、ポリメチルメタアクリレート、ポリカーボネイトなどのプラスチック類、ステンレススチール、金、アルミニウム、アルミニウム合金、チタニウムなどの金属類、セラミック類、炭素複合材料などの複合素材、石英などの中から選択することができるが、これらに限定されない。ガラスは脱アルカリ処理ガラスを用いることも好ましい。脱アルカリ処理は、例えば、ガラスに硫酸アンモニウム水溶液を接触させて、高温加熱せしめ、洗浄する方法、あるいはガラス表面に高温状態で亜硫酸ガスなどの水溶性硫黄酸化物と接触させて、表面のアルカリ成分を微細な硫酸塩結晶とし、その後洗浄する方法により行うことができる。プラスチック類の中ではポリプロピレン、環状ポリオレフィン、環状ポリオレフィンと α オレフィンの共重合体が好ましい。さらに環状ポリオレフィ

ンが特に好ましい。

本発明における該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤を溶解する際の容器の内壁としては、容器を栓（アンプル等の場合は熔閉）した時に、容器の中で溶解液が接触可能な容器の部分を指す。

本発明における該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤を溶解する際の容器の内壁に施されるシリコーンでのコーティングとしては、通常の方法、通常の方法が使用可能である。シリコーンとしては、例えば、ジメチルポリシロキサン、メチルヒドロジェンポリシロキサンなどのシリコーンオイル、およびメチルワニスシリコーン、メチルフェニルワニスシリコーンなどが挙げられる。また本発明においてシリコーンをコーティングする方法としては、通常の方法、例えばシリコーン溶液に容器全体を浸漬する処理、またはシリコーン溶液を容器内壁にスプレーする処理、またはシリコーン溶液を容器に注入して内壁に接触させた後に余分のシリコーン溶液を排出する処理などの処理後に、溶媒を蒸発させることにより得ることができる。シリコーン溶液の溶媒としては、四塩化炭素や、トリクロルエチレンなどが挙げられるが、溶剤の安全性からはシリコーンを乳化させた水系エマルジョンを用いることも好ましい。水系エマルジョンの溶媒除去の場合は、ガラスにおいては 100～800 °C の高温で加熱することが好ましく、250～350 °C の高温で加熱することがより好ましい。樹脂などにおいては軟化しない程度の温度が望ましい。また、シリコーンの量は、通常、付着させるシリコーン溶液の濃度によっても表わすことが簡便と考えられる。例えば、濃度 1 w/v% のシリコーン溶液を容器に付着させて溶媒を除去する場合に、「1 w/v% のシリコーンコーティング」として表示することとした場合には、容器内壁へのシリコーンコーティング量は、下限としては、例えば 0.01 w/v% 以上が好ましく、より好ましくは 0.05 w/v% 以上、さらに好ましくは 0.1 w/v% 以上、場合によっては 0.5 w/v% 以上、または 1 w/v% 以上、さらには 2 w/v% 以上が好ましい例として挙げられる。上限としては、通常 10 w/v% 以下であり、好ましくは 7 w/v% 以下、さらに好ましくは 5 w/v% 以下、場合によっては 2 w/v% 以下が挙げられる。

または以下に、(c) 該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤を溶解する際の容器内圧力が減圧状態であること、について説明する。

すなわち、本発明の起泡抑制方法においては、該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤を溶解する際の容器内圧力が減圧状態であることが好ましい。通常、容器内の圧力が大気圧(760 mmHg)より低いことと理解され、減圧状態を作る方法としては、どのような手段であってもよいが、例えば該凍結乾燥製剤を溶解する際に溶解用水溶液をシリンジで注入した後に、そのシリンジで容器内の気体を吸引して大気圧より減圧状態にする方法が挙げられる。また、溶解用水溶液をシリンジで注入した後に、真空ポンプ等の減圧装置を接続した注射針で容器内の気体を吸引する方法も挙げられる。また、溶解用水溶液をシリンジで注入する前に容器内を減圧しておくことも好ましく、凍結乾燥の製剤化工程において、減圧状態のままに栓をすることも検討しえることとなるが、例えば、空のシリンジや真空ポンプを接続した注射針で容器内の気体を溶解工程以前に予め吸引することも好ましい例として挙げられる。該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤を溶解する際の容器内圧力の減圧状態は、例えば大気圧(760 mmHg)より 200 mmHg 減圧された状態を-200 mmHg の減圧度と表記することがある。設定された溶解時の減圧度を達成するために、あらかじめ減圧しておく場合に、添加される溶解用水溶液等の容量の変化を確認して、初期減圧度を決め、溶解以前に初期減圧度まで減圧しておくことが好ましい。初期減圧度は、実施例に記載された方法や、その他の適宜の方法により決めればよい。

該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤を溶解する際に、起泡抑制する好ましい容器内圧力は、容器の容量、形式や溶解用水溶液の量によって若干異なるため、上記の気泡の発生程度を濁度として波長 650 nm の透過率を測定する方法において、95%以上の透過率を示すような減圧状態とすることが好ましく、特に限定されるものではない。例えば、3 mL バイアル瓶中の可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤を 1 mL の溶解用水溶液で溶解する際は、容器内圧力の下限としては-50 mmHg 以上が好ましく、-100 mmHg 以上がさらに好ましく、場合によっては-200 mmHg 以上、または-300 mmHg 以上である例が挙げられる。上限としては通常-600 mmHg 以下が例示され、好ましくは-500 mmHg 以下、さらに好ましくは-400 mmHg 以下、場合によっては-300 mmHg 以下が挙げられる。さらに本発明は、前述の起泡抑制効果、および／または後述の安定化効果を有する可溶性

トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤、さらには、凍結乾燥製剤とその溶解用水溶液とが組み合わされたキット製剤を提供するものである。

すなわち本発明は、有効成分として可溶性トロンボモジュリンを含有する可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤、または該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤とその溶解用水溶液とを組み合わせしめたキット製剤であって、該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤が 10 mg/mL 以上の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有溶液を調製されるためのものであって、且つ(a) 該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤中に、非イオン性界面活性剤、ベンジルアルコール、クロロブタノールからなる群より選ばれる少なくとも一種の化合物が存在せしめられているか、および/または該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤の溶解用水溶液中に、非イオン性界面活性剤、ベンジルアルコール、クロロブタノールからなる群より選ばれる少なくとも一種の化合物が存在せしめられていること、(b) 該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤を溶解する際の容器の内壁がシリコーンでコーティングされていること、または(c) 該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤を溶解する際の容器内圧力が減圧状態であること、の少なくともいずれかを特徴とする可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤、またはそのキット製剤である。

本発明の可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤、またはそのキット製剤としては、上記の(a)、(b)、(c)のいずれかが好ましいが、好ましくは(a)であり、さらに(a)且つ(c)や、(a)且つ(b)も好ましい。また(b)且つ(c)も好ましく、(a)且つ(b)且つ(c)が特に好ましい例として挙げられることは前記と同様である。

さらに具体的には、本発明は、有効成分として可溶性トロンボモジュリンを含有する可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤、または該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤とその溶解用水溶液とを組み合わせしめたキット製剤であって、該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤が 10 mg/mL 以上の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有溶液を調製されるためのものであって、該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤は、(1) グルタミン酸またはその塩、およびマンニトールの 2 種を含む、(2) グルタミン酸またはその塩、およびリシンまたはその塩の 2 種を含む、(3) グルタミン酸またはその塩、およびアスパラ

ギン酸またはその塩の 2 種を含む、または(4) アスパラギン酸またはその塩、およびマンニトールの 2 種を含む、のいずれかの組み合わせを含有せしめ、且つ該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤が、0.1 mL から 2 mL の溶解用水溶液に溶解し得て、10 mg/mL 以上の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有溶液を調整でき、その溶解時の浸透圧比が 0.5 から 2.0 であることを特徴とする可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤である。

また本発明は、有効成分として可溶性トロンボモジュリンを含有する可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤、または該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤とその溶解用水溶液とを組み合わせしめたキット製剤であって、該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤が 10 mg/mL 以上の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有溶液を調製されるためのものであって、該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤は、(1) グルタミン酸またはその塩、およびマンニトールの 2 種を含む、(2) グルタミン酸またはその塩、およびリシンまたはその塩の 2 種を含む、(3) グルタミン酸またはその塩、およびアスパラギン酸またはその塩の 2 種を含む、または(4) アスパラギン酸またはその塩、およびマンニトールの 2 種を含む、のいずれかの組み合わせを含有せしめ、且つ該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤が、0.1 mL から 2 mL の溶解用水溶液に溶解し得て、10 mg/mL 以上の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有溶液を調製でき、その溶解時の浸透圧比が 0.5 から 2.0 であり、且つ該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤中に、非イオン性界面活性剤、ベンジルアルコール、クロロブタノールからなる群より選ばれる少なくとも一種の化合物が存在せしめられていることを特徴とする可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤である。この場合に、(b)、または(c)、それらの組み合わせであることが好ましいことは前述の通りである。

さらに本発明は、有効成分として可溶性トロンボモジュリンを含有する可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤、または該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤とその溶解用水溶液とを組み合わせしめたキット製剤であって、該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤が 10 mg/mL 以上の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有溶液を調製されるためのものであって、該可溶性トロンボ

モジュリン含有凍結乾燥製剤は、(1) グルタミン酸またはその塩、およびマンニトールの 2 種を含む、(2) グルタミン酸またはその塩、およびリシンまたはその塩の 2 種を含む、(3) グルタミン酸またはその塩、およびアスパラギン酸またはその塩の 2 種を含む、または(4) アスパラギン酸またはその塩、およびマンニトールの 2 種を含む、のいずれかの組み合わせを含有せしめ、且つ該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤が、0.1 mL から 2 mL の溶解用水溶液に溶解し得て、10 mg/mL 以上の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有溶液を調製でき、その溶解時の浸透圧比が 0.5 から 2.0 であることを特徴とし、さらに該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤の溶解用水溶液中に、非イオン性界面活性剤、ベンジルアルコール、クロロブタノールからなる群より選ばれる少なくとも一種の化合物が存在せしめられていることを特徴とする可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤のキット製剤である。この場合に、(b)、または(c)、それらの組み合わせであることが好ましいことは前述の通りである。

またさらに本発明は、有効成分として可溶性トロンボモジュリンを含有する可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤、または該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤とその溶解用水溶液とを組み合わせしめたキット製剤であって、該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤が 10 mg/mL 以上の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有溶液を調製されるためのものであって、該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤は、(1) グルタミン酸またはその塩、およびマンニトールの 2 種を含む、(2) グルタミン酸またはその塩、およびリシンまたはその塩の 2 種を含む、(3) グルタミン酸またはその塩、およびアスパラギン酸またはその塩の 2 種を含む、または(4) アスパラギン酸またはその塩、およびマンニトールの 2 種を含む、のいずれかの組み合わせを含有せしめ、且つ該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤が、0.1 mL から 2 mL の溶解用水溶液に溶解し得て、10 mg/mL 以上の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有溶液を調製でき、その溶解時の浸透圧比が 0.5 から 2.0 であり、且つ該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤中に、非イオン性界面活性剤、ベンジルアルコール、クロロブタノールからなる群より選ばれる少なくとも一種の化合物が存在せしめられており、さらに該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤の溶解用水溶液中に、非イ

オン性界面活性剤、ベンジルアルコール、クロロブタノールからなる群より選ばれる少なくとも一種の化合物が存在せしめられていることを特徴とする可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤のキット製剤である。この場合に、(b)、または(c)、それらの組み合わせであることが好ましいことは前述の通りである。

この発明においても、可溶性トロンボモジュリンに関する諸性質や濃度等について前述の起泡抑制方法と同様である。

さらに本発明は、有効成分として可溶性トロンボモジュリンを含有する可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤における可溶性トロンボモジュリンの安定化方法であって、(1) グルタミン酸またはその塩、およびマンニトールの2種を含む、(2) グルタミン酸またはその塩、およびリシンまたはその塩の2種を含む、(3) グルタミン酸またはその塩、およびアスパラギン酸またはその塩の2種を含む、または(4) アスパラギン酸またはその塩、およびマンニトールの2種を含む、のいずれかの組み合わせを含有せしめ、且つ該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤が、0.1 mL から 2 mL の溶解用水溶液に溶解し得て、10 mg/mL 以上、好ましくは 15 または 17 mg/mL 以上の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有溶液を調製でき、その溶解時の浸透圧比が 0.5 から 2.0 であることを特徴とする可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤における可溶性トロンボモジュリンの安定化方法である。

可溶性トロンボモジュリン高濃度含有凍結乾燥製剤における可溶性トロンボモジュリンの安定化効果を示す、例えば、(1) グルタミン酸またはその塩、およびマンニトールの2種を含む、(2) グルタミン酸またはその塩、およびリシンまたはその塩の2種を含む、(3) グルタミン酸またはその塩、およびアスパラギン酸またはその塩の2種を含む、または(4) アスパラギン酸またはその塩、およびマンニトールの2種を含む、等の添加剤を、以下安定化添加剤とすることがある。

本発明の安定化方法に適するより好ましい製剤としては以下が挙げられる。すなわち、本発明は、有効成分として可溶性トロンボモジュリンを 10 mg/mL 以上、好ましくは 15 または 17 mg/mL 以上含有する可溶性トロンボモジュリン高濃度含有凍結乾燥製剤であって、グルタミン酸またはその塩、およびマンニトールを含有せしめ、且つ該製剤が、0.1 mL から 2 mL の溶解用水溶液に溶解し得るもので

あって、その溶解時の浸透圧比が 0.5 から 2.0 であることを特徴とする可溶性トロンボモジュリン高濃度含有凍結乾燥製剤である。

また本発明は、有効成分として可溶性トロンボモジュリンを 10 mg/mL 以上、好ましくは 15 または 17 mg/mL 以上含有する可溶性トロンボモジュリン高濃度含有凍結乾燥製剤であって、グルタミン酸またはその塩、および、リシンまたはその塩を含有せしめ、且つ該製剤が、0.1 mL から 2 mL の溶解用水溶液に溶解し得るものであって、その溶解時の浸透圧比が 0.5 から 2.0 であることを特徴とする可溶性トロンボモジュリン高濃度含有凍結乾燥製剤である。

また本発明は、有効成分として可溶性トロンボモジュリンを 10 mg/mL 以上、好ましくは 15 または 17 mg/mL 以上含有する可溶性トロンボモジュリン高濃度含有凍結乾燥製剤であって、グルタミン酸またはその塩、およびアスパラギン酸またはその塩を含有せしめ、且つ該製剤が、0.1 mL から 2 mL の溶解用水溶液に溶解し得るものであって、その溶解時の浸透圧比が 0.5 から 2.0 であることを特徴とする可溶性トロンボモジュリン高濃度含有凍結乾燥製剤である。

また本発明は、有効成分として可溶性トロンボモジュリンを 10 mg/mL 以上、好ましくは 15 または 17 mg/mL 以上含有する可溶性トロンボモジュリン高濃度含有凍結乾燥製剤であって、アスパラギン酸またはその塩、およびマンニトールを含有せしめ、且つ該製剤が、0.1 mL から 2 mL の溶解用水溶液に溶解し得るものであって、その溶解時の浸透圧比が 0.5 から 2.0 であることを特徴とする可溶性トロンボモジュリン高濃度含有凍結乾燥製剤である。

安定化効果を達成するに際しても、前述の可溶性トロンボモジュリンの性質、構造等が引用でき、また可溶性トロンボモジュリン高濃度含有溶液の濃度や溶解用水溶液等においても同様である。

本発明の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有溶液の液量は、0.1 mL から 2 mL であって、その溶液の浸透圧比が 0.5 から 2.0 であることが好ましい。浸透圧比としては製剤の投与時に疼痛を感じないことが望ましいが、通例 0.5 以上が好ましく、さらに好ましくは 0.8 以上が挙げられる。上限としては、2.0 以下が好ましく、さらに好ましくは 1.5 以下、特に好ましくは 1.2 以下が挙げられる。

本発明の浸透圧比は、生理食塩液の与えるオスモル濃度に対する試料溶液のオ

スモル濃度の比と定義（第 14 改正日本薬局方、浸透圧測定法）され、生理食塩液 (0.900 g/100mL) のオスモル濃度は一定 (286mOsm) であることから、次式で計算することができる [浸透圧比 = 試料溶液のオスモル濃度 (mOsm) / 286 (mOsm)]。なお、オスモル濃度は、第 14 改正日本薬局方の浸透圧測定法、あるいは USP24<785> OSMOLARITY に記載の方法で求めることができ、単位は mOsm (milliosmoles per liter) を用いて示す。

本発明のグルタミン酸は、光学活性体である D 体、または L 体のいずれか、またはそれらの混合物であるラセミ体のいずれであっても良いが、L 体であることが好ましい。グルタミン酸の塩としては、水溶性の塩であることが好ましく、例えばその酸付加塩が好ましい例として挙げられる。酸付加塩の場合、付加しうる酸として通常、塩酸、硫酸、硝酸、酢酸、リン酸、シュウ酸、クエン酸、酒石酸などが例示されるが、好ましくは塩酸、酢酸、リン酸であり、さらに好ましくは塩酸が挙げられる。また、他の塩としては、アンモニウム塩が好ましい例として挙げられる。また、例えばアルカリ金属やアルカリ土類金属との塩も好ましい例として挙げられる。アルカリ金属としては、例えばナトリウム、カリウム、リチウムなどが挙げられ、好ましくはナトリウム、カリウムであり、さらに好ましくはナトリウムが挙げられる。また、アルカリ土類金属との塩も好ましい例として挙げられる。アルカリ土類金属としては例えばマグネシウム、カルシウム、ベリリウムなどが挙げられ、好ましくはマグネシウム、カルシウムであり、さらに好ましくはカルシウムである。これらのグルタミン酸およびその塩は、無水物の他、適宜の水和物が利用できる。具体的には、グルタミン酸ナトリウム一水和物が好ましい例として挙げられる。なお、これらのグルタミン酸およびその塩の添加量を考慮する際には、特別にことわりのない限り、フリー体のグルタミン酸としての換算値として表示する。

また、マンニトールは、D 体、または L 体のいずれか、またはそれらの混合物のいずれであっても良いが、D-マンニトールが好ましい例として挙げられる。

また、トレハロースは、D 体、または L 体のいずれか、またはそれらの混合物のいずれであっても良い。また、無水物の他、適宜の水和物が利用できる。具体的には、D-トレハロース二水和物が好ましい例として挙げられる。

また、リシン（リジンとも言う）は、光学活性体であるD体、またはL体のいずれか、またはそれらの混合物であるラセミ体のいずれであっても良いが、L体であることが好ましい。リシンの塩としては、水溶性の塩であることが好ましく、例えばその酸付加塩が好ましい例として挙げられる。酸付加塩の場合、付加する酸として通常、塩酸、硫酸、硝酸、酢酸、リン酸、シュウ酸、クエン酸、酒石酸などが例示されるが、好ましくは塩酸、酢酸、リン酸であり、さらに好ましくは塩酸が挙げられる。これらのリシンおよびその塩は、無水物の他、適宜の水和物が利用できる。具体的には、リシン水和物が好ましい例として挙げられる。なお、これらのリシンおよびその塩の添加量を考慮する際には、特別にことわりのない限り、フリー体のリシンとしての換算値として表示する。

また、グルタミン酸またはその塩、および、リシンまたはその塩の組み合わせを実施する際には、一括して、リシングルタミン酸塩無水物やリシングルタミン酸塩二水和物などを利用することも好ましい例として挙げられる。このリシングルタミン酸塩二水和物の量を考慮する際には、リシンとグルタミン酸とに分けての換算値として表示する。

また、アスパラギン酸は、光学活性体であるD体、またはL体のいずれか、またはそれらの混合物であるラセミ体のいずれであっても良いが、L体であることが好ましい。アスパラギン酸の塩としては、水溶性の塩であることが好ましく、例えばアルカリ金属やアルカリ土類金属との塩も好ましい例として挙げられる。アルカリ金属としては、例えばナトリウム、カリウム、リチウムなどが挙げられ、好ましくはナトリウム、カリウムであり、さらに好ましくはナトリウムが挙げられる。また、アルカリ土類金属との塩も好ましい例として挙げられる。アルカリ土類金属としては例えばマグネシウム、カルシウム、ベリリウムなどが挙げられ、好ましくはマグネシウム、カルシウムであり、さらに好ましくはカルシウムである。これらのアスパラギン酸およびその塩は、無水物の他、適宜の水和物が利用できる。具体的には、アスパラギン酸ナトリウム一水和物が好ましい例として挙げられる。なお、これらのアスパラギン酸およびその塩の添加量を考慮する際には、特別にことわりのない限り、フリー体のアスパラギン酸としての換算値として表示する。

また、本発明のアルギニン、プロリン、セリン、グリシン、ヒスチジン、アスパラギン、フェニルアラニンおよびバリンにおいても、光学活性体であるD体、またはL体のいずれか、またはそれらの混合物であるラセミ体のいずれであっても良い。また、塩としては、水溶性の塩であることが好ましく、例えばアルカリ金属やアルカリ土類金属との塩も好ましい例として挙げられる。これらのアミノ酸およびその塩は、無水物の他、適宜の水和物が利用できる。例えばこれらのアミノ酸のうち、アルギニンについてはアルギニン塩酸塩が好ましい例として挙げられる。これらのアミノ酸およびその塩の添加量を考慮する際には、特別にことわりのない限り、フリー体のアミノ酸としての換算値として表示する。

さらに、本発明の製剤中に添加される、上述の安定化添加剤の添加量の比は、互いに 50:50 が特に好ましい例であり、また、60:40～40:60 も好ましい例として挙げられ、さらにまた 80:20～20:80 も例示される。おのおのの添加量は、適宜選択できるが、例えば、可溶性トロンボモジュリン 1 mg あたりの添加量の下限として、通常 0.0001 mmol 以上が例示され、好ましくは 0.0003 mmol 以上、より好ましくは 0.0007 mmol 以上、特に好ましくは 0.001 mmol 以上が例示される。また、可溶性トロンボモジュリン 1 mg あたりの添加量の上限として、通常 1 mmol 以下が例示され、好ましくは 0.7 mmol 以下、より好ましくは 0.3 mmol 以下、特に好ましくは 0.1 mmol 以下が例示される。上記の添加量としては、本発明の安定化効果を示し、且つ浸透圧比が 0.5 から 2.0 の範囲に調整できる添加量であれば特に限定されず、例えば塩酸塩やナトリウム塩のように水に溶解した時に電離（解離）する添加剤の場合は浸透圧比が高くなるので添加量を、上述の例示された添加量を適宜増減し、求められる浸透圧比に適宜調整することが好ましい。

本発明で上記の起沫抑制添加剤、および／または安定化添加剤を含む可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤においては、上記起沫抑制添加剤や安定化添加剤の他に、その他の成分として医薬品の添加剤として許容できる、等張化剤、緩衝化剤、増粘剤、保存剤、防腐剤、無痛化剤、pH調整剤などを適宜添加しても良い。なお、起沫抑制添加剤としてベンジルアルコールやクロロブタノールを用いる場合には、無痛化剤としての作用も併せて示すことができるため、好ましい。界面活性剤としては、例えばポリオキシエチレン硬化ヒマシ油 60、ポリオキシエ

チレン硬化ヒマシ油 50、ポリソルベート 80、ポリソルベート 20、ポリオキシエチレン(160)ポリオキシプロピレン(30)グリコールなどが挙げられる。

本発明の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤の製造に際しては、適宜の方法が採用できるが、例えば、適当量の可溶性トロンボモジュリンと上述の添加物、またはその溶液を、同時または順次混合して全ての組成物の混合溶液を調製し、公知の方法により凍結乾燥することにより、調製することが可能である。

例えば、上記起泡抑制添加剤、および／または安定化添加剤や、その他の成分の添加剤の添加方法は、直接可溶性トロンボモジュリン高濃度含有溶液に添加する方法、または、あらかじめ起泡抑制添加剤、安定化添加剤や、その他の成分の添加剤を、水、注射用水、あるいは適当な緩衝液に溶解後、可溶性トロンボモジュリン高濃度含有溶液に添加する方法などが挙げられる。添加時期はいつでも良いが、好ましくは可溶性トロンボモジュリンの精製過程や濃縮過程、さらに好ましくは製剤化工程中が例示される。また、製剤化工程中で可溶性トロンボモジュリン高濃度含有溶液の pH は、特に好ましくは中性付近が例示される。さらに、その pH の下限としては、通常 pH 4 以上、好ましくは pH 5 以上、より好ましくは pH 6 以上、特に好ましくは pH 6.5 以上が例示される。また、pH の上限としては通常 pH 11 以下が例示され、好ましくは pH 10 以下、より好ましくは pH 9 以下、さらに好ましくは pH 8 以下、特に好ましくは pH 7.5 以下が例示される。前述の pH となすためには、必要により、適宜の pH 調整剤などを添加して調整すれば良い。pH 調整剤としては、例えば塩酸、酢酸、クエン酸、リン酸、リン酸二水素ナトリウム、リン酸水素ナトリウム、水酸化ナトリウム、水酸化カリウムなどが例示され、好ましくは塩酸、水酸化ナトリウムなどである。調整時期は特に限定されないが、無菌ろ過工程の直前が好ましい。また、可溶性トロンボモジュリンの精製過程や濃縮過程でも良い。調整方法は特に限定されないが、サンプリングした溶液の pH を pH 測定装置で測り、例えば pH が低ければ水酸化ナトリウム水溶液を滴下して pH を調整すればよい。

上記のように製剤化工程中で調製した可溶性トロンボモジュリンおよび必要により添加される起泡抑制添加剤、および／または安定化添加剤を含み、さらに所望により適宜のその他の添加剤を含有してなる溶液を、例えば 0.22 μm のフィルタ

ーを通して無菌ろ過することが好ましい。かくして得られた可溶性トロンボモジュリンおよび必要により添加される起泡抑制添加剤、安定化添加剤、またはその他の添加剤を含有してなる溶液を容器に充填し、そのまま密封して製剤としてもよいが、凍結乾燥することがより好ましい。凍結乾燥方法は特に制限はなく、通常の方法で凍結乾燥することができる。また、凍結乾燥の方法により、該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤中に上記起泡抑制添加剤を存在せしめる場合には、起泡抑制添加剤としては非イオン性界面活性剤が好ましい。

容器に充填され、凍結乾燥される溶液の量として、特に好ましくは 0.5 から 1.0 mL が例示される。すなわち、その下限としては 0.1 mL 以上が好ましく、より好ましくは 0.3 mL 以上、特に好ましくは 0.5 mL 以上が例示される。また、溶液の量の上限としては通常 10 mL 以下が例示され、好ましくは 5 mL 以下、より好ましくは 2 mL 以下、特に好ましくは 1 mL 以下が挙げられる。

本発明の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤は、可溶性トロンボモジュリンの量として、製剤あたり、5 mg 以上含むことが通常であり、10 mg 以上含むことが好ましく、15 mg 以上がさらに好ましい。またさらに、17 mg 以上が好ましく、20 mg 以上、または 25 mg 以上がさらに好ましく、30 mg 以上含むことも特に好ましい例として挙げられる。

容器としては、前述の通りであるが、医薬品の容器として使用可能なもので無菌充填することに適した材料、形状であれば特に限定されず、例えばガラス製バイアル（および栓）、ガラス製シリンジ（さらにゴム製キャップおよびストッパー）、ガラス製アンプルなどが挙げられ、その他にプラスチック製容器を用いることもできる。本発明において、ガラス製バイアルに封入せしめた凍結乾燥製剤として提供することが好ましい。また、例えば凍結乾燥製剤に、溶解用水溶液が組み合わされた、又は添付されているキット製剤が好ましく、凍結乾燥製剤や、溶解用水溶液は、それぞれ別の容器に充填されており、例えば、凍結乾燥製剤が無菌充填されたガラス製バイアルと、溶解用水溶液が無菌充填されたプレフィルドシリンジの組み合わせからなるキット製剤が好ましい例として挙げられる。また、ガラス製またはプラスチック製のダブルチャンバーあるいはデュアルチャンバーと言われる 2 室式シリンジ（1 本のシリンジに 2 室があり、例えば 1 室に凍

結乾燥物を、もう1室に溶解用水溶液が封入されている)もキット製剤として好ましい。また、2室式シリンジの別タイプとして、製造や流通時は2室が分離しており、使用時に2室を組み合わせるにより1体となし溶解するタイプも好ましい。

本発明の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤は、製剤として流通時または使用までの間、数ヶ月～数年間保存されることができる。その投与方法としては、一般的に使用されている投与方法、すなわち非経口投与方法、例えば静脈内投与、筋肉内投与、皮下投与等によって投与することができるが、特に筋肉内投与、皮下投与に用いることが最も好ましい。凍結乾燥製剤とした場合は、用時に、水、例えば蒸留水（または、注射用水）等にて溶解して患者に投与することができるが、前述の通りであって、特に筋肉内投与、皮下投与に用いる場合には、0.1 mL から 2 mL、好ましくは 0.3 mL から 1.5 mL、特に好ましくは 0.5 mL から 1 mL 程度が例示される。

本発明の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤の投与量は、患者の年齢、体重、疾患の程度、投与経路などによっても異なるが、一般的に可溶性トロンボモジュリンの量として体重あたり 0.001 から 5 mg/kg の範囲であり、好ましくは 0.02 から 2 mg/kg、さらに好ましくは 0.05 から 1 mg/kg、特に好ましくは 0.1 から 0.5 mg/kg が挙げられ、1日あたり1回または必要に応じて数回投与する。投与間隔は毎日でも良いが、好ましくは2日から14日間に1回、さらに好ましくは3日から10日間に1回、さらに好ましくは4日から7日に1回とすることも可能である。特に、筋肉内投与、皮下投与においては、血中濃度が長期間維持されることより、投与間隔を長くできるので、好ましい。

また、本発明は、有効成分として可溶性トロンボモジュリンを含有する可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤における可溶性トロンボモジュリンの安定化方法であって、(1) 尿素、または(2) 尿素およびアミノ酸を含有せしめ、且つ該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤が、0.1 mL から 2 mL の溶解用水溶液に溶解し得て、10 mg/mL 以上、好ましくは 20 mg/mL 以上の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有溶液を調製でき、その溶解時の浸透圧比が 0.5 から 2.0 であることを特徴とする可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤における可溶

性トロンボモジュリンの安定化方法であり、またそれに最適な製剤である。

本発明の可溶性トロンボモジュリンは前述と同様であり、その製剤中での含有量も前述と同様であり、例えば、通常は 10 mg/mL 以上、15 mg/mL 以上、または 17 mg/mL 以上含有することが例示され、20 mg/mL 以上、25 mg/mL 以上、または 30 mg/mL 以上含有することがさらに好ましい例として挙げられる。

尿素は、酸付加塩であってもよく、例えば尿素リン酸塩、尿素硝酸塩などが挙げられるが、好ましくは尿素である。なお、これらの尿素およびその酸付加塩の添加量を考慮する際には、特別にことわりのない限り、フリー体の尿素としての換算値として表示する。

尿素と組み合わせることのできるアミノ酸としては、グルタミン酸またはその塩、アスパラギン酸またはその塩が好ましい例として例示される。これらのアミノ酸やその塩についての詳細な例示は前述の通りである。添加物の比率、添加量、浸透圧比は前述と同様である。基本的に製造方法や投与方法、用量等は前述の開示が参考にできる。なお前述のとおり、これらの組成も、起泡抑制方法における可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤、又はそのキット製剤として利用することができる。

実施例

以下、参考例、実施例、比較例、投与例および実験例により本発明を具体的に説明するが、本発明は何らこれらによって限定されるものではない。

以下の参考例、実施例および比較例において、有効成分である可溶性トロンボモジュリンの他、次のような製剤原料を用いた。

L-グルタミン酸ナトリウム一水和物（特級、和光純薬工業株式会社）、D(-)-マンニトール（特級、和光純薬工業株式会社）、L-リシン塩酸塩（特級、和光純薬工業株式会社）、L-リシン-L-グルタミン酸塩二水和物（味の素株式会社）、L-アスパラギン酸ナトリウム一水和物（特級、和光純薬工業株式会社）、尿素（小堺製薬株式会社）、L-アルギニン塩酸塩（特級、和光純薬工業株式会社）、スクロース（特級、和光純薬工業株式会社）、D-トレハロース二水和物（特級、和光純薬工業株式会社）、Polysorbate 80（日光ケミカルズ株式会社）、Polysorbate 20

(日光ケミカルズ株式会社)、Poloxamer 188 (BASF)、Polyoxyethylene(25)lauryl ether (日光ケミカルズ株式会社)、Polyoxyl 40 stearate (日光ケミカルズ株式会社)、HCO-60 (Polyoxyl 60 hydrogenated castor oil; 日光ケミカルズ株式会社)、ラウリル硫酸ナトリウム (一級、和光純薬工業株式会社)、塩化ベンザルコニウム (ICN Biochemicals Inc.)、ベンジルアルコール (特級、和光純薬工業株式会社)、クロロブタノール (特級、和光純薬工業株式会社)、塩化ナトリウム (特級、和光純薬工業株式会社)、リン酸 (特級、和光純薬工業株式会社)、水酸化ナトリウム (特級、和光純薬工業株式会社)、注射用水 (大塚製薬株式会社)、生理食塩液 (大塚製薬株式会社)

参考例 1

本実施例で用いる可溶性トロンボモジュリンの生産

実施例に用いる可溶性トロンボモジュリンは、前記山本らの方法 (特開昭 64-6219 号公報の実施例 10 に記載の方法) に従い生産し、さらに限外濾過により濃縮を行って得た。すなわち配列表配列番号 1 のアミノ酸配列をコードする DNA (具体的には、配列表配列番号 2 の塩基配列よりなる) を、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞にトランスフェクションして、この形質転換細胞の培養液より上述あるいは定法の精製法にて、50 mM NaCl を含む 20 mM リン酸塩緩衝液 (pH7.3) で活性画分を回収した高純度精製品を取得した。さらに、限外濾過を行って可溶性トロンボモジュリン濃度が 60 mg/mL である TMD123H を取得した。同様に、配列表配列番号 3 のアミノ酸配列をコードする DNA (具体的には、配列表配列番号 4 の塩基配列よりなる) を用いることにより、配列表配列番号 3 のアミノ酸配列の 19-132 のアミノ酸を少なくとも有するペプチド (以下、TME456H と略することがある) を取得した。

また、配列表配列番号 2 の塩基配列を含む DNA 断片および配列表配列番号 9 に示された塩基配列を有する変異用合成 DNA を用いて前述の部位特異的変異を行い、配列表配列番号 5 のアミノ酸配列をコードする DNA (具体的には、配列表配列番号 6 の塩基配列よりなる) を取得した。この DNA 配列を CHO 細胞にトランスフェクションして、この形質転換細胞の培養液より上述あるいは定法の精製法にて、50 mM NaCl を含む 20 mM リン酸塩緩衝液 (pH7.3) で活性画分を回収した高純度精

製品を取得した。さらに、限外濾過を行って可溶性トロンボモジュリン濃度が 60mg/mL である配列表配列番号 5 のアミノ酸配列の 19-516 のアミノ酸を少なくとも有するペプチド（以下、TMD123HM と略すことがある）を取得した。同様に、配列表配列番号 4 の塩基配列を含む DNA 断片および配列表配列番号 9 に示された塩基配列を有する変異用合成 DNA を用いて前述の部位特異的変異を行い、配列表配列番号 7 のアミノ酸配列をコードする DNA（具体的には、配列表配列番号 8 の塩基配列よりなる）を取得した。この DNA 配列を CHO 細胞にトランスフェクションし、上述の方法にて配列表配列番号 7 のアミノ酸配列の 19-132 のアミノ酸を少なくとも有するペプチド（以下、TME456HM と略すことがある）を取得した。

実施例 1-1

添加剤溶液調製

20 mL のメスフラスコに、L-グルタミン酸ナトリウム一水和物 2.5 mmol および D (-)-マンニトール 2.5 mmol を量り入れ（表 1 に記載している添加剤量のそれぞれ 50 倍量にあたる）、注射用水を加え溶解して 20 mL とした。

試料溶液調製

上記添加剤溶液 4 mL を 15 mL のアシストチューブに入れ、参考例 1 で得られた TMD123H を 5 mL（可溶性トロンボモジュリンとして表 1 記載の 10 倍量にあたる 300 mg 含有する）および注射用水を 1 mL 加え、混合攪拌した。この試料溶液をデイスポシリンジ 25 mL（テルモ製）を用い、孔径：0.22 μ m（MILLEX-GV、ミリポア製）のフィルターを付けてろ過滅菌し、特別に限定しない限りシリコーンコーティング未処理の無菌バイアルビン（3010、不二硝子製）に 1 mL ずつ分注した。

凍結乾燥

ゴム栓（大協精工製）半打栓→凍結乾燥→窒素充填→ゴム栓打栓→キャップ巻締め順で以下の条件にて凍結乾燥工程を行い、1 容器中に可溶性トロンボモジュリン 30 mg、L-グルタミン酸ナトリウム一水和物 0.05 mmol、D (-)-マンニトール 0.05 mmol を含む可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た（実施例 1-1-1）。

〔凍結乾燥条件〕

予備冷却（15 分かけて室温から 15℃）→ 本冷却（2 時間かけて 15℃から-

45℃) → 保持 (2 時間 -45℃) → 真空開始 (18 時間 -45℃) → 昇温 (20 時間かけて -45℃から 25℃) → 保持 (15 時間 25℃) → 昇温 (1 時間かけて 25℃から 45℃) → 保持 (5 時間 45℃) → 室温 (2 時間かけて 45℃から 25℃) → 復圧窒素充填 (-100 mmHg まで窒素で復圧) → 打栓 → キャップ
巻締め

実施例 1-1-2、実施例 1-1-3、実施例 1-1-4

同様に、可溶性トロンボモジュリンの種類を変えて実施例 1-1-1 の TMD123H の代わりに TMD123HM (実施例 1-1-2)、TME456H (実施例 1-1-3)、および TME456HM (実施例 1-1-4)を用いて、それぞれ上記の方法にしたがって可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た。

表 1

実施例及び比較例	組成	1 容器当りの添加量
実施例 1-1-1	TMD123H	30mg
	L-グルタミン酸 Na 一水和物	0.05mmol
	D(-)-マンニトール	0.05mmol
実施例 1-1-2	TMD123HM	30mg
	L-グルタミン酸 Na 一水和物	0.05mmol
	D(-)-マンニトール	0.05mmol
実施例 1-1-3	TME456H	30mg
	L-グルタミン酸 Na 一水和物	0.05mmol
	D(-)-マンニトール	0.05mmol
実施例 1-1-4	TME456HM	30mg
	L-グルタミン酸 Na 一水和物	0.05mmol

	D(-)-マンニトール	0.05mmol
実施例 1-2-1	TMD123H	30mg
	L-グルタミン酸 Na 一水和物	0.075mmol
	D(-)-マンニトール	0.075mmol
実施例 1-3-1	TMD123H	30mg
	L-グルタミン酸 Na 一水和物	0.025mmol
	D(-)-マンニトール	0.025mmol
実施例 1-4-1	TMD123H	30mg
	L-グルタミン酸 Na 一水和物	0.02mmol
	D(-)-マンニトール	0.10mmol
実施例 1-5-1	TMD123H	30mg
	L-グルタミン酸 Na 一水和物	0.07mmol
	D(-)-マンニトール	0.02mmol
実施例 1-6-1	TMD123H	30mg
	L-グルタミン酸 Na 一水和物	0.03mmol
	D(-)-マンニトール	0.15mmol
実施例 1-7-1	TMD123H	30mg
	L-グルタミン酸 Na 一水和物	0.10mmol
	D(-)-マンニトール	0.03mmol
実施例 1-8-1	TMD123H	30mg
	L-グルタミン酸 Na 一水和物	0.05mmol
	L-リシン塩酸塩	0.05mmol

実施例 1-9-1	TMD123H	30mg
	L-グルタミン酸 Na 一水和物	0.03mmol
	L-リシン塩酸塩	0.07mmol
実施例 1-10-1	TMD123H	30mg
	(L-リシン-L-グルタミン酸塩二水和物)	
	リシン	0.10mmol
	グルタミン酸	0.10mmol
実施例 1-11-1	TMD123H	30mg
	(L-リシン-L-グルタミン酸塩二水和物)	
	リシン	0.15mmol
	グルタミン酸	0.15mmol
実施例 1-12-1	TMD123H	30mg
	L-グルタミン酸 Na 一水和物	0.06mmol
	L-アスパラギン酸 Na 一水和物	0.06mmol
実施例 1-13-1	TMD123H	30mg
	L-アスパラギン酸 Na 一水和物	0.05mmol
	D(-)-マンニトール	0.05mmol
実施例 1-14-1	TMD123H	30mg
	尿素	0.07mmol
実施例 1-15-1	TMD123H	30mg
	尿素	0.05mmol
	L-グルタミン酸 Na 一水和物	0.05mmol

実施例 1-16-1	TMD123H	30mg
	尿素	0.05mmol
	L-アスパラギン酸 Na 一水和物	0.05mmol
実施例 1-17-1	TMD123H	30mg
	L-グルタミン酸 Na 一水和物	0.05mmol
	D(-)-マンニトール	0.05mmol
実施例 1-18-1	TMD123H	30mg
	L-アスパラギン酸 Na 一水和物	0.05mmol
	D(-)-マンニトール	0.05mmol
実施例 1-19-1	TMD123H	15mg
	L-グルタミン酸 Na 一水和物	0.025mmol
	D(-)-マンニトール	0.025mmol
実施例 1-20-1	TMD123H	10mg
	L-グルタミン酸 Na 一水和物	0.017mmol
	D(-)-マンニトール	0.017mmol
実施例 1-21-1	TMD123H	15mg
	L-グルタミン酸 Na 一水和物	0.038mmol
	D(-)-マンニトール	0.038mmol
実施例 1-22-1	TMD123H	10mg
	L-グルタミン酸 Na 一水和物	0.025mmol
	D(-)-マンニトール	0.025mmol

実施例 1-23-1	TMD123H	15mg
	L-グルタミン酸 Na 一水和物	0.0125mmol
	D(-)-マンニトール	0.0125mmol
実施例 1-24-1	TMD123H	10mg
	L-グルタミン酸 Na 一水和物	0.0083mmol
	D(-)-マンニトール	0.0083mmol
実施例 1-25-1	TMD123H	30mg
	L-アスパラギン酸 Na 一水和物	0.075mmol
	D(-)-マンニトール	0.075mmol
実施例 1-26-1	TMD123H	30mg
	L-アスパラギン酸 Na 一水和物	0.025mmol
	D(-)-マンニトール	0.025mmol
実施例 1-27-1	TMD123H	30mg
	L-アスパラギン酸 Na 一水和物	0.02mmol
	D(-)-マンニトール	0.10mmol
実施例 1-28-1	TMD123H	30mg
	L-アスパラギン酸 Na 一水和物	0.07mmol
	D(-)-マンニトール	0.02mmol
実施例 1-29-1	TMD123H	30mg
	L-アスパラギン酸 Na 一水和物	0.03mmol
	D(-)-マンニトール	0.15mmol
実施例 1-30-1	TMD123H	30mg

	L-アスパラギン酸 Na 一水和物	0.10mmol
	D(-)-マンニトール	0.03mmol
<hr/>		
実施例 1-31-1	TMD123H	15mg
	L-アスパラギン酸 Na 一水和物	0.025mmol
	D(-)-マンニトール	0.025mmol
<hr/>		
実施例 1-32-1	TMD123H	10mg
	L-アスパラギン酸 Na 一水和物	0.017mmol
	D(-)-マンニトール	0.017mmol
<hr/>		
実施例 1-33-1	TMD123H	15mg
	L-アスパラギン酸 Na 一水和物	0.038mmol
	D(-)-マンニトール	0.038mmol
<hr/>		
実施例 1-34-1	TMD123H	10mg
	L-アスパラギン酸 Na 一水和物	0.025mmol
	D(-)-マンニトール	0.025mmol
<hr/>		
実施例 1-35-1	TMD123H	15mg
	L-アスパラギン酸 Na 一水和物	0.0125mmol
	D(-)-マンニトール	0.0125mmol
<hr/>		
実施例 1-36-1	TMD123H	10mg
	L-アスパラギン酸 Na 一水和物	0.0083mmol
	D(-)-マンニトール	0.0083mmol
<hr/>		
実施例 1-37-1	TMD123H	30mg
	L-グルタミン酸 Na 一水和物	0.05mmol

D(-)-マンニトール	0.05mmol
塩化ナトリウム	0.05mmol
リン酸(水酸化ナトリウムにて pH7.3 に中和)	0.02mmol

実施例 1-38-1	TMD123H	30mg
	L-アスパラギン酸 Na 一水和物	0.05mmol
	D(-)-マンニトール	0.05mmol
	塩化ナトリウム	0.05mmol
	リン酸(水酸化ナトリウムにて pH7.3 に中和)	0.02mmol

実施例 1-39-1	TMD123H	30mg
	L-アスパラギン酸 Na 一水和物	0.05mmol
	D(-)-マンニトール	0.05mmol
	Polysorbate 80	0.1mg

実施例 1-40-1	TMD123H	30mg
	L-グルタミン酸 Na 一水和物	0.05mmol
	D(-)-マンニトール	0.05mmol
	Polysorbate 80	0.1mg

実施例 1-41-1	TMD123H	30mg
	L-アスパラギン酸 Na 一水和物	0.05mmol
	D(-)-マンニトール	0.05mmol
	Poloxamer 188	0.1mg

実施例 1-42-1	TMD123H	30mg
	L-アスパラギン酸 Na 一水和物	0.05mmol
	D(-)-マンニトール	0.05mmol

	Polysorbate 80 (溶解用水溶液中添加)	0.1mg
<hr/>		
実施例 1-43-1	TMD123H	30mg
	L-アスパラギン酸 Na 一水和物	0.05mmol
	D(-)-マンニトール	0.05mmol

	ベンジルアルコール (溶解用水溶液中添加)	10mg
<hr/>		
実施例 1-44-1	TMD123H	30mg
	L-アスパラギン酸 Na 一水和物	0.05mmol
	D(-)-マンニトール	0.05mmol

	クロロブタノール (溶解用水溶液中添加)	5mg
<hr/>		
実施例 1-45-1	TMD123H	30mg
	L-グルタミン酸 Na 一水和物	0.05mmol
	D(-)-マンニトール	0.05mmol

	Polysorbate 80 (溶解用水溶液中添加)	0.1mg
<hr/>		
実施例 1-46-1	TMD123H	30mg
	L-グルタミン酸 Na 一水和物	0.05mmol
	D(-)-マンニトール	0.05mmol

	ベンジルアルコール (溶解用水溶液中添加)	10mg
<hr/>		
実施例 1-47-1	TMD123H	30mg
	L-グルタミン酸 Na 一水和物	0.05mmol
	D(-)-マンニトール	0.05mmol

クロロブタノール（溶解用水溶液中添加） 5mg

実施例 1-48-1	TMD123H	30mg
	L-アスパラギン酸 Na 一水和物	0.05mmol
	D(-)-マンニトール	0.05mmol
	Polysorbate 80	0.05mg

Polysorbate 80（溶解用水溶液中添加） 0.05mg

実施例 1-49-1	TMD123H	30mg
	L-アスパラギン酸 Na 一水和物	0.05mmol
	D(-)-マンニトール	0.05mmol
	Polysorbate 80	0.05mg

ベンジルアルコール（溶解用水溶液中添加） 5mg

実施例 1-50-1	TMD123H	30mg
	L-アスパラギン酸 Na 一水和物	0.05mmol
	D(-)-マンニトール	0.05mmol
	Polysorbate 80	0.05mg

クロロブタノール（溶解用水溶液中添加） 2.5mg

実施例 1-51-1	TMD123H	30mg
	L-グルタミン酸 Na 一水和物	0.05mmol
	D(-)-マンニトール	0.05mmol
	Polysorbate 80	0.05mg

	Polysorbate 80 (溶解用水溶液中添加)	0.05mg
<hr/>		
実施例 1-52-1	TMD123H	30mg
	L-グルタミン酸 Na 一水和物	0.05mmol
	D(-)-マンニトール	0.05mmol
	Polysorbate 80	0.05mg

	ベンジルアルコール (溶解用水溶液中添加)	5mg
<hr/>		
実施例 1-53-1	TMD123H	30mg
	L-グルタミン酸 Na 一水和物	0.05mmol
	D(-)-マンニトール	0.05mmol
	Polysorbate 80	0.05mg

	クロロブタノール (溶解用水溶液中添加)	2.5mg
<hr/>		
比較例 1-1	TMD123H	15mg
	L-アルギニン-塩酸塩	0.75mmol
	スクロース	0.75mmol
<hr/>		
比較例 1-2	TMD123H	10mg
	L-アルギニン-塩酸塩	0.5mmol
	スクロース	0.5mmol
<hr/>		
比較例 1-3	TMD123H	30mg
<hr/>		
比較例 1-4	TMD123H	30mg
	L-グルタミン酸 Na 一水和物	0.025mmol
<hr/>		

比較例 1-5	TMD123H	30mg
	D(-)- マンニトール	0.025mmol
比較例 1-6	TMD123H	30mg
	L-グルタミン酸 Na 一水和物	0.05mmol
比較例 1-7	TMD123H	30mg
	D(-)- マンニトール	0.05mmol
比較例 1-8	TMD123H	30mg
	L-グルタミン酸 Na 一水和物	0.075mmol
比較例 1-9	TMD123H	30mg
	D(-)- マンニトール	0.075mmol
比較例 1-10	TMD123H	30mg
	L-アスパラギン酸 Na 一水和物	0.025mmol
比較例 1-11	TMD123H	30mg
	L-アスパラギン酸 Na 一水和物	0.05mmol
比較例 1-12	TMD123H	30mg
	L-アスパラギン酸 Na 一水和物	0.075mmol

実施例 1-2

実施例 1-1 と同様の方法で、表 1 記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た（実施例 1-1-1、1-1-2、1-1-3、1-1-4 に準じて、可溶性トロンボモジュリンの種類を変え、それぞれ実施例 1-2-1、実施例 1-2-2、実施例 1-2-3、

実施例 1-2-4 を調製した)。

実施例 1 - 3

実施例 1 - 1 と同様の方法で、表 1 記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た (前述と同様に、それぞれ実施例 1-3-1、実施例 1-3-2、実施例 1-3-3、実施例 1-3-4 を調製した)。

実施例 1 - 4

実施例 1 - 1 と同様の方法で、表 1 記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た (前述と同様に、それぞれ実施例 1-4-1、実施例 1-4-2、実施例 1-4-3、実施例 1-4-4 を調製した)。

実施例 1 - 5

実施例 1 - 1 と同様の方法で、表 1 記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た (前述と同様に、それぞれ実施例 1-5-1、実施例 1-5-2、実施例 1-5-3、実施例 1-5-4 を調製した)。

実施例 1 - 6

実施例 1 - 1 と同様の方法で、表 1 記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た (前述と同様に、それぞれ実施例 1-6-1、実施例 1-6-2、実施例 1-6-3、実施例 1-6-4 を調製した)。

実施例 1 - 7

実施例 1 - 1 と同様の方法で、表 1 記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た (前述と同様に、それぞれ実施例 1-7-1、実施例 1-7-2、実施例 1-7-3、実施例 1-7-4 を調製した)。

実施例 1 - 8

実施例 1 - 1 と同様の方法で、表 1 記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た (前述と同様に、それぞれ実施例 1-8-1、実施例 1-8-2、実施例 1-8-3、実施例 1-8-4 を調製した)。

実施例 1 - 9

実施例 1 - 1 と同様の方法で、表 1 記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た (前述と同様に、それぞれ実施例 1-9-1、実施例 1-9-2、実施例 1-9-3、実施例 1-9-4 を調製した)。

実施例 1-10

実施例 1-1 と同様の方法で、表 1 記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た（前述と同様に、それぞれ実施例 1-10-1、実施例 1-10-2、実施例 1-10-3、実施例 1-10-4 を調製した）。

実施例 1-11

実施例 1-1 と同様の方法で、表 1 記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た（前述と同様に、それぞれ実施例 1-11-1、実施例 1-11-2、実施例 1-11-3、実施例 1-11-4 を調製した）。

実施例 1-12

実施例 1-1 と同様の方法で、表 1 記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た（前述と同様に、それぞれ実施例 1-12-1、実施例 1-12-2、実施例 1-12-3、実施例 1-12-4 を調製した）。

実施例 1-13

実施例 1-1 と同様の方法で、表 1 記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た（前述と同様に、それぞれ実施例 1-13-1、実施例 1-13-2、実施例 1-13-3、実施例 1-13-4 を調製した）。

実施例 1-14

実施例 1-1 と同様の方法で、表 1 記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た（前述と同様に、それぞれ実施例 1-14-1、実施例 1-14-2、実施例 1-14-3、実施例 1-14-4 を調製した）。

実施例 1-15

実施例 1-1 と同様の方法で、表 1 記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た（前述と同様に、それぞれ実施例 1-15-1、実施例 1-15-2、実施例 1-15-3、実施例 1-15-4 を調製した）。

実施例 1-16

実施例 1-1 と同様の方法で、表 1 記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た（前述と同様に、それぞれ実施例 1-16-1、実施例 1-16-2、実施例 1-16-3、実施例 1-16-4 を調製した）。

実施例 1-17

実施例 1-1 の試料溶液調製で試料溶液を無菌バイアルビンに分注する代わりに 2 室式シリンジ（アルテ製）の 1 室に 1 mL ずつ分注した。これらを、ミドル栓半打栓→凍結乾燥→窒素充填→ミドル栓打栓の順で凍結乾燥工程（凍結乾燥条件は実施例 1-1 と同様）を行った。次にもう 1 室側に注射用水 0.75 mL を無菌的に充填し、ゴム栓で封印したのち、プランジャーロッドを取りつけ可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤のキット製剤を得た（前述と同様に、それぞれ実施例 1-17-1、実施例 1-17-2、実施例 1-17-3、実施例 1-17-4 を調製した）。

実施例 1-18

実施例 1-13 の試料溶液調製で無菌バイアルビンの代わりに 2 室式シリンジ（アルテ製）の 1 室に 1 mL ずつ分注した。これらを、ミドル栓半打栓→凍結乾燥→窒素充填→ミドル栓打栓の順で凍結乾燥工程（凍結乾燥条件は実施例 1-1 と同様）を行った。次にもう 1 室側に注射用水 0.75 mL を無菌的に充填し、ゴム栓で封印したのち、プランジャーロッドを取りつけ可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤のキット製剤を得た（前述と同様に、それぞれ実施例 1-18-1、実施例 1-18-2、実施例 1-18-3、実施例 1-18-4 を調製した）。

実施例 1-19

実施例 1-1 で無菌ろ過した試料溶液を無菌バイアルビンに 0.5 mL ずつ分注した以外は同様の方法で、表 1 記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た（前述と同様に、それぞれ実施例 1-19-1、実施例 1-19-2、実施例 1-19-3、実施例 1-19-4 を調製した）。

実施例 1-20

実施例 1-1 で無菌ろ過した試料溶液を無菌バイアルビンに 0.333 mL ずつ分注した以外は同様の方法で、表 1 記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た（前述と同様に、それぞれ実施例 1-20-1、実施例 1-20-2、実施例 1-20-3、実施例 1-20-4 を調製した）。

実施例 1-21

実施例 1-2 で無菌ろ過した試料溶液を無菌バイアルビンに 0.5 mL ずつ分注した以外は同様の方法で、表 1 記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た（前述と同様に、それぞれ実施例 1-21-1、実施例 1-21-2、実施例 1-21-3、

実施例 1-21-4 を調製した)。

実施例 1 - 2 2

実施例 1 - 2 で無菌ろ過した試料溶液を無菌バイアルビンに 0.333 mL ずつ分注した以外は同様の方法で、表 1 記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た (前述と同様に、それぞれ実施例 1-22-1、実施例 1-22-2、実施例 1-22-3、実施例 1-22-4 を調製した)。

実施例 1 - 2 3

実施例 1 - 3 で無菌ろ過した試料溶液を無菌バイアルビンに 0.5 mL ずつ分注した以外は同様の方法で、表 1 記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た (前述と同様に、それぞれ実施例 1-23-1、実施例 1-23-2、実施例 1-23-3、実施例 1-23-4 を調製した)。

実施例 1 - 2 4

実施例 1 - 3 で無菌ろ過した試料溶液を無菌バイアルビンに 0.333 mL ずつ分注した以外は同様の方法で、表 1 記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た (前述と同様に、それぞれ実施例 1-24-1、実施例 1-24-2、実施例 1-24-3、実施例 1-24-4 を調製した)。

実施例 1 - 2 5

実施例 1 - 1 と同様の方法で、表 1 記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た (前述と同様に、それぞれ実施例 1-25-1、実施例 1-25-2、実施例 1-25-3、実施例 1-25-4 を調製した)。

実施例 1 - 2 6

実施例 1 - 1 と同様の方法で、表 1 記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た (前述と同様に、それぞれ実施例 1-26-1、実施例 1-26-2、実施例 1-26-3、実施例 1-26-4 を調製した)。

実施例 1 - 2 7

実施例 1 - 1 と同様の方法で、表 1 記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た (前述と同様に、それぞれ実施例 1-27-1、実施例 1-27-2、実施例 1-27-3、実施例 1-27-4 を調製した)。

実施例 1 - 2 8

実施例 1-1 と同様の方法で、表 1 記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た（前述と同様に、それぞれ実施例 1-28-1、実施例 1-28-2、実施例 1-28-3、実施例 1-28-4 を調製した）。

実施例 1-29

実施例 1-1 と同様の方法で、表 1 記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た（前述と同様に、それぞれ実施例 1-29-1、実施例 1-29-2、実施例 1-29-3、実施例 1-29-4 を調製した）。

実施例 1-30

実施例 1-1 と同様の方法で、表 1 記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た（前述と同様に、それぞれ実施例 1-30-1、実施例 1-30-2、実施例 1-30-3、実施例 1-30-4 を調製した）。

実施例 1-31

実施例 1-13 で無菌ろ過した試料溶液を無菌バイアルビンに 0.5 mL ずつ分注した以外は同様の方法で、表 1 記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た（前述と同様に、それぞれ実施例 1-31-1、実施例 1-31-2、実施例 1-31-3、実施例 1-31-4 を調製した）。

実施例 1-32

実施例 1-13 で無菌ろ過した試料溶液を無菌バイアルビンに 0.333 mL ずつ分注した以外は同様の方法で、表 1 記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た（前述と同様に、それぞれ実施例 1-32-1、実施例 1-32-2、実施例 1-32-3、実施例 1-32-4 を調製した）。

実施例 1-33

実施例 1-25 で無菌ろ過した試料溶液を無菌バイアルビンに 0.5 mL ずつ分注した以外は同様の方法で、表 1 記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た（前述と同様に、それぞれ実施例 1-33-1、実施例 1-33-2、実施例 1-33-3、実施例 1-33-4 を調製した）。

実施例 1-34

実施例 1-25 で無菌ろ過した試料溶液を無菌バイアルビンに 0.333 mL ずつ分注した以外は同様の方法で、表 1 記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製

剤を得た（前述と同様に、それぞれ実施例 1-34-1、実施例 1-34-2、実施例 1-34-3、実施例 1-34-4 を調製した）。

実施例 1-35

実施例 1-26 で無菌ろ過した試料溶液を無菌バイアルビンに 0.5 mL ずつ分注した以外は同様の方法で、表 1 記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た（前述と同様に、それぞれ実施例 1-35-1、実施例 1-35-2、実施例 1-35-3、実施例 1-35-4 を調製した）。

実施例 1-36

実施例 1-26 で無菌ろ過した試料溶液を無菌バイアルビンに 0.333 mL ずつ分注した以外は同様の方法で、表 1 記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た（前述と同様に、それぞれ実施例 1-36-1、実施例 1-36-2、実施例 1-36-3、実施例 1-36-4 を調製した）。

実施例 1-37

添加剤溶液調製

20 mL のメスフラスコに L-グルタミン酸ナトリウム一水和物 2.5 mmol および D(-)-マンニトール 2.5 mmol を量り入れ、注射用水を加え溶解して 20 mL とした。

試料溶液調製

上記添加剤溶液 4 mL を 15 mL のアシストチューブに入れ、参考例 1 で得られた TMD123H を 5 mL（可溶性トロンボモジュリンとして 300 mg 含有する）および 50 mM NaCl を含む 20 mM リン酸塩緩衝液 (pH7.3) を 1 mL 加え、混合攪拌した。この試料溶液をディスポシリンジ 25 mL（テルモ製）を用い、孔径：0.22 μ m（MILLEX-GV、ミリポア製）のフィルターを付けてろ過滅菌し、無菌バイアルビン（3010、不二硝子製）に 1 mL ずつ分注した。

凍結乾燥

ゴム栓半打栓→凍結乾燥→窒素充填→ゴム栓打栓→キャップ巻締め順で以下の条件にて凍結乾燥工程を行い、可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た（実施例 1-37-1）。

[50 mM NaCl を含む 20 mM リン酸塩緩衝液 (pH7.3) の調製方法]

1000 mL ビーカーにリン酸を 2306 mg、塩化ナトリウムを 2937 mg 量り入れる。注射用水を 750 mL 加え攪拌溶解する。17%水酸化ナトリウム溶液(水酸化ナトリウム 17.71 g を注射用水で溶かし、100 mL とした溶液)で pH7.3 に調整し、注射用水を加え、1000 mL とする。

〔凍結乾燥条件〕

予備冷却 (15 分かけて室温から 15℃) → 本冷却 (2 時間かけて 15℃から -45℃) → 保持 (2 時間 -45℃) → 真空開始 (18 時間 -45℃) → 昇温 (20 時間かけて -45℃から 25℃) → 保持 (15 時間 25℃) → 昇温 (1 時間かけて 25℃から 45℃) → 保持 (5 時間 45℃) → 室温 (2 時間かけて 45℃から 25℃) → 復圧窒素充填 (-100 mmHg まで窒素で復圧) → 打栓 → キャップ巻締め

同様に、可溶性トロンボモジュリンの種類を変えて参考例 1 で得られた TMD123H の代わりに TMD123HM (実施例 1-37-2)、TME456H (実施例 1-37-3)、および TME456HM (実施例 1-37-4) を用いて、それぞれ上記の方法にしたがって可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た。

実施例 1-38

L-グルタミン酸ナトリウム一水和物の代わりに、L-アスパラギン酸ナトリウム一水和物を量り入れる以外は実施例 1-37 と同様の方法で、可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た (実施例 1-37-1、1-37-2、1-37-3、1-37-4 に準じて、可溶性トロンボモジュリンの種類を変え、それぞれ実施例 1-38-1、実施例 1-38-2、実施例 1-38-3、実施例 1-38-4 を調製した)。

実施例 1-39

添加剤溶液調製

20 mL のメスフラスコに L-アスパラギン酸ナトリウム一水和物 2.5 mmol および D(-)-マンニトール 2.5 mmol、および Polysorbate 80 (5 mg) を量り入れ、注射用水を加え溶解して 20 mL とした。

実施例 1-1 の添加剤溶液を上記とする以外は同様の方法で、可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た (前述と同様に、それぞれ実施例 1-39-1、実施例 1-39-2、実施例 1-39-3、実施例 1-39-4 を調製した)。

実施例 1-40

添加剤溶液調製

20 mL のメスフラスコに L-グルタミン酸ナトリウム一水和物 2.5 mmol および D(-)-マンニトール 2.5 mmol、および Polysorbate 80 (5 mg) を量りいれ、注射用水を加え溶解して 20 mL とした。

実施例 1-1 の添加剤溶液を上記とする以外は同様の方法で、可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た（前述と同様に、実施例 1-40-1 を調製した）。

実施例 1-41

添加剤溶液調製

20 mL のメスフラスコに L-アスパラギン酸ナトリウム一水和物 2.5 mmol および D(-)-マンニトール 2.5 mmol、および Poloxamer 188 (5 mg) を量りいれ、注射用水を加え溶解して 20 mL とした。

実施例 1-1 の添加剤溶液を上記とする以外は同様の方法で、可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た（前述と同様に、実施例 1-41-1 を調製した）。

実施例 1-42

実施例 1-13 で得られた可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤と、溶解用水溶液として注射用水 1 mL に Polysorbate 80 を 0.1 mg 含有する溶液を 1 mL 無菌的に充填してなるアンプルとを組み合わせた可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤のキット製剤を得た。（前述と同様に、実施例 1-42-1 を調製した）。

実施例 1-43

実施例 1-13 で得られた可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤と、溶解用水溶液として注射用水 1 mL にベンジルアルコールを 10 mg 含有する溶液を 1 mL 無菌的に充填してなるアンプルとを組み合わせた可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤のキット製剤を得た。（前述と同様に、実施例 1-43-1 を調製した）。

実施例 1-44

実施例 1-13 で得られた可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤と、溶解用水溶液として注射用水 1 mL にクロロブタノールを 5 mg 含有する溶液を 1 mL 無菌的に充填してなるアンプルとを組み合わせた可溶性トロンボモジュリン含有

凍結乾燥製剤のキット製剤を得た。(実施例 1-44-1 を調製した)。

実施例 1-45

実施例 1-1 で得られた可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤と、溶解用水溶液として注射用水 1 mL に Polysorbate 80 を 0.1 mg 含有する溶液を 1 mL 無菌的に充填してなるアンプルとを組み合わせた可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤のキット製剤を得た。(前述と同様に、それぞれ実施例 1-45-1、実施例 1-45-2、実施例 1-45-3、実施例 1-45-4 を調製した)。

実施例 1-46

実施例 1-1 で得られた可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤と、溶解用水溶液として注射用水 1 mL にベンジルアルコールを 10 mg 含有する溶液を 1 mL 無菌的に充填してなるアンプルとを組み合わせた可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤のキット製剤を得た。(前述と同様に、実施例 1-46-1 を調製した)。

実施例 1-47

実施例 1-1 で得られた可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤と、溶解用水溶液として注射用水 1 mL にクロロブタノールを 5 mg 含有する溶液を 1 mL 無菌的に充填してなるアンプルとを組み合わせた可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤のキット製剤を得た。(前述と同様に、実施例 1-47-1 を調製した)。

実施例 1-48

添加剤溶液調製

20 mL のメスフラスコに L-アスパラギン酸ナトリウム一水和物 2.5 mmol および D(-)-マンニトール 2.5 mmol、および Polysorbate 80 (2.5 mg) を量り入れ、注射用水を加え溶解して 20 mL とした。

実施例 1-1 の添加剤溶液を上記とする以外は同様の方法で得た可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤と、溶解用水溶液として注射用水 1 mL に Polysorbate 80 を 0.05 mg 含有する溶液を 1 mL 無菌的に充填してなるアンプルとを組み合わせしめた可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤のキット製剤を得た。(前述と同様に、実施例 1-48-1 を調製した)。

実施例 1-49

添加剤溶液調製

20 mL のメスフラスコに L-アスパラギン酸ナトリウム一水和物 2.5 mmol および D(-)-マンニトール 2.5 mmol、および Polysorbate 80 (2.5 mg) を量り入れ、注射用水を加え溶解して 20 mL とした。

実施例 1-1 の添加剤溶液を上記とする以外は同様の方法で得た可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤と、溶解用水溶液として注射用水 1 mL にベンジルアルコールを 5 mg 含有する溶液を 1 mL 無菌的に充填してなるアンプルとを組み合わせしめた可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤のキット製剤を得た。

(前述と同様に、実施例 1-49-1 を調製した)。

実施例 1-50

添加剤溶液調製

20 mL のメスフラスコに L-アスパラギン酸ナトリウム一水和物 2.5 mmol および D(-)-マンニトール 2.5 mmol、および Polysorbate 80 (2.5 mg) を量り入れ、注射用水を加え溶解して 20 mL とした。

実施例 1-1 の添加剤溶液を上記とする以外は同様の方法で得た可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤と、溶解用水溶液として注射用水 1 mL にクロロブタノールを 2.5 mg 含有する溶液を 1 mL 無菌的に充填してなるアンプルとを組み合わせしめた可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤のキット製剤を得た。

(前述と同様に、実施例 1-50-1 を調製した)。

実施例 1-51

添加剤溶液調製

20 mL のメスフラスコに L-グルタミン酸ナトリウム一水和物 2.5 mmol および D(-)-マンニトール 2.5 mmol、および Polysorbate 80 (2.5 mg) を量り入れ、注射用水を加え溶解して 20 mL とした。

実施例 1-1 の添加剤溶液を上記とする以外は同様の方法で得た可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤と、溶解用水溶液として注射用水 1 mL に Polysorbate 80 を 0.05 mg 含有する溶液を 1 mL 無菌的に充填してなるアンプルとを組み合わせしめた可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤のキット製剤を得た。(前述と同様に、実施例 1-51-1 を調製した)。

実施例 1-52

添加剤溶液調製

20 mL のメスフラスコに L-グルタミン酸ナトリウム一水和物 2.5 mmol および D(-)-マンニトール 2.5 mmol、および Polysorbate 80 (2.5 mg) を量り入れ、注射用水を加え溶解して 20 mL とした。

実施例 1-1 の添加剤溶液を上記とする以外は同様の方法で得た可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤と、溶解用水溶液として注射用水 1 mL にベンジルアルコールを 5 mg 含有する溶液を 1 mL 無菌的に充填してなるアンプルとを組み合わせしめた可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤のキット製剤を得た。

(前述と同様に、実施例 1-52-1 を調製した)。

実施例 1-53

添加剤溶液調製

20 mL のメスフラスコに L-グルタミン酸ナトリウム一水和物 2.5 mmol および D(-)-マンニトール 2.5 mmol、および Polysorbate 80 (2.5 mg) を量り入れ、注射用水を加え溶解して 20 mL とした。

実施例 1-1 の添加剤溶液を上記とする以外は同様の方法で得た可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤と、溶解用水溶液として注射用水 1 mL にクロロブタノールを 2.5 mg 含有する溶液を 1 mL 無菌的に充填してなるアンプルとを組み合わせしめた可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤のキット製剤を得た。

(前述と同様に、実施例 1-53-1 を調製した)。

比較例 1-1

20 mL のメスフラスコに L-アルギニン塩酸塩 20 mmol およびスクロース 20 mmol を量り入れ、注射用水を加え溶解して 20 mL とした。ここから 7.5 mL を 15 mL のアシストチューブに入れ、参考例 1 で得られた TMD123H を 2.5 mL (可溶性トロンボモジュリンとして 150 mg 含有する) 加え、混合攪拌した。この試料溶液をディスポシリンジ 25 mL (テルモ製) を用い、孔径: 0.22 μ m (MILLEX-GV、ミリポア製) のフィルターを付けてろ過滅菌し、特別に限定しない限りシリコーンコーティング未処理の無菌バイアルビン (3010、不二硝子製) に 1 mL ずつ分注した。

凍結乾燥

ゴム栓半打栓→凍結乾燥→窒素充填→ゴム栓打栓→キャップ巻締め of 順で実施

例 1-1 記載の条件にて凍結乾燥工程を行い、1 容器中に可溶性トロンボモジュリン 15 mg、L-アルギニン塩酸塩 0.75 mmol、スクロース 0.75 mmol を含む組成物を得た。

比較例 1-2

20 mL のメスフラスコに L-アルギニン塩酸塩 20 mmol およびスクロース 20 mmol を量り入れ、注射用水を加え溶解して 20 mL とした。ここから 5 mL を 15 mL のアシストチューブに入れ、参考例 1 で得られた TMD123H を 1.67 mL (可溶性トロンボモジュリンとして 100 mg 含有する) および注射用水 3.33 mL 加え、混合撹拌した以外は比較例 1-1 と同様の方法で、表 1 記載の組成物を得た。

比較例 1-3

15 mL のアシストチューブに、参考例 1 で得られた TMD123H を 5 mL (可溶性トロンボモジュリンとして 300 mg 含有する) および注射用水 5 mL 加え、混合撹拌した以外は比較例 1-1 と同様の方法で、表 1 記載の組成物を得た。

比較例 1-4

実施例 1-1 の添加剤溶液調製で、表 1 記載の添加剤を 1.25 mmol 量り入れる以外は同様の方法で、表 1 記載の組成物を得た。

比較例 1-5

実施例 1-1 の添加剤溶液調製で、表 1 記載の添加剤を 1.25 mmol 量り入れる以外は同様の方法で、表 1 記載の組成物を得た。

比較例 1-6

実施例 1-1 の添加剤溶液調製で、表 1 記載の添加剤を 2.5 mmol 量り入れる以外は同様の方法で、表 1 記載の組成物を得た。

比較例 1-7

実施例 1-1 の添加剤溶液調製で、表 1 記載の添加剤を 2.5 mmol 量り入れる以外は同様の方法で、表 1 記載の組成物を得た。

比較例 1-8

実施例 1-1 の添加剤溶液調製で、表 1 記載の添加剤を 3.75 mmol 量り入れる以外は同様の方法で、表 1 記載の組成物を得た。

比較例 1-9

実施例 1-1 の添加剤溶液調製で、表 1 記載の添加剤を 3.75 mmol 量り入れる以外は同様の方法で、表 1 記載の組成物を得た。

比較例 1-10

実施例 1-1 の添加剤溶液調製で、表 1 記載の添加剤を 1.25 mmol 量り入れる以外は同様の方法で、表 1 記載の組成物を得た。

比較例 1-11

実施例 1-1 の添加剤溶液調製で、表 1 記載の添加剤を 2.5 mmol 量り入れる以外は同様の方法で、表 1 記載の組成物を得た。

比較例 1-12

実施例 1-1 の添加剤溶液調製で、表 1 記載の添加剤を 3.75 mmol 量り入れる以外は同様の方法で、表 1 記載の組成物を得た。

投与例 1

実施例 1-1-1 で得た可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を、注射用水 0.75 mL を加えて再溶解し、投与用組成物を得た。

投与例 2

実施例 1-1-2 で得た可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を、注射用水 0.75 mL を加えて再溶解し、投与用組成物を得た。

投与例 3

実施例 1-1-3 で得た可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を、注射用水 0.75 mL を加えて再溶解し、投与用組成物を得た。

投与例 4

実施例 1-1-4 で得た可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を、注射用水 0.75 mL を加えて再溶解し、投与用組成物を得た。

投与例 5

実施例 1-2-1 で得た可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を、注射用水 1.0 mL を加えて再溶解し、投与用組成物を得た。

投与例 6

実施例 1-1-1 で得た可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を、注射用水 1.5 mL を加えて再溶解し、投与用組成物を得た。

投与例 7

実施例 1-1-1 で得た可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を、注射用水 0.5 mL を加えて再溶解し、投与用組成物を得た。

比較投与例 1

生理食塩液を投与用組成物とした。

比較投与例 2

塩化ナトリウム 9.00 g を注射用水に溶解して 100 mL とし、投与用組成物を得た。

比較投与例 3

比較例 1-1 で得た組成物を、注射用水 1.0 mL を加えて再溶解し、投与用組成物を得た。

比較投与例 4

比較例 1-2 で得た組成物を、注射用水 2.0 mL を加えて再溶解し、投与用組成物を得た。

比較投与例 5

比較例 1-3 で得た組成物を、注射用水 1.0 mL を加えて再溶解し、投与用組成物を得た。

実験例 1

疼痛試験

表 2 に示された投与例又は比較投与例の投与溶液の疼痛の程度を Quartaroli M らの方法 (J. Pharmacol. Exp. Ther., 290(1):158-69, 1999) に準じて評価した。CD マウス (25-30 g、チャールスリバー) を一晩絶食させ 12 群に分けた後、透明個別ケージに 15 分入れて馴化させた。各投与例および比較投与例の投与溶液を左後肢に 20 μ L 皮下投与した。投与後直ちに個別ケージに戻し、5 分間に左後肢の持ち上げ時間および投与部位をなめる時間をトータルでカウントし疼痛の指標とした。実験は 1 匹ずつ行い、1 群 $n = 6$ 匹で平均時間を求めた。結果を表 2 に示す。

実験例 2

実験例 1 で用いた各投与溶液の浸透圧比を求めた。

浸透圧比の求め方

浸透圧比は、生理食塩液の与えるオスモル濃度に対する試料溶液のオスモル濃度の比と定義（第 14 改正日本薬局方、浸透圧測定法）され、生理食塩液 (0.900 g/100mL) のオスモル濃度は一定 (286mOsm) であることから次式で計算した〔浸透圧比＝試料溶液のオスモル濃度 (mOsm) / 286 (mOsm)〕。

なお、オスモル濃度は、第 14 改正日本薬局方の浸透圧測定法にしたがって求めた。すなわち、浸透圧測定装置 (VOGEL 社製 OM802-D) を用いて、以下の方法に従ってあらかじめ二点校正法により装置の校正を行い、装置の適合性を確認したのちに試料溶液のオスモル濃度を測定した。

装置の校正法

注射用水（大塚製薬製）でゼロ補正を行い、次に装置校正用オスモル濃度標準液 200mOsm および 400mOsm で装置の校正を行った。

〔装置校正用オスモル濃度標準液 200mOsm の調製〕

塩化ナトリウム（和光純薬）を 600℃で 50 分間乾燥し、デシケーター（シリカゲル）中で放冷する。この塩化ナトリウム 0.626 g を正確に量り、注射用水 100 g を加えて溶かした。

〔装置用オスモル濃度標準液 400mOsm の調製〕

塩化ナトリウム（和光純薬）を 600℃で 50 分間乾燥し、デシケーター（シリカゲル）中で放冷する。この塩化ナトリウム 1.270 g を正確に量り、注射用水 100 g を加えて溶かした。

装置の適合性

300mOsm 標準液 (VOGEL 社製) を 6 回繰り返し測定を行って、6 回の相対標準偏差が 2 % 以内であり、測定値が 291～309mOsm であることを確認した。

試料溶液の測定

各投与溶液を専用サンプルカップ (VOGEL 社製) に採取し測定を行った。なお、比較投与例 2, 3, 4 で得られた投与溶液は注射用水 (大塚製薬製) でそれぞれ 10, 10, 3 倍に希釈して、この液につき同様な測定を行い、得られたオスモル濃度を 10, 10, 3 倍した。表 2 にその結果を示した。

表 2 から明らかなように、投与例 1 から 7 の各投与溶液は、マウスにおいて疼

痛時間は非常に短く、比較投与例 1 の生理食塩液とほぼ同等であり、疼痛の程度は大きいものではないことがわかった。比較投与例 2 から 4 の投与溶液は、疼痛時間が長いものであり、従って疼痛の程度が大きく好ましくないことが確認された。実験例 2 の浸透圧比を調べてみたところ表 2 で示したとおり疼痛時間の短い組成物は浸透圧比が 1 付近にあり、顕著に疼痛時間が長い組成物は浸透圧比が高いまたは低いものであった。

表 2 から明らかなように、実施例で得られた可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を 0.1 mL から 2 mL の溶解用水溶液に溶解したときの浸透圧比がほぼ 1 となり、該製剤は例えば筋肉内投与や皮下投与方法の投与方法に採用できることが明確となった。

表 2

投与例	投与溶液		疼痛時間 (秒)	浸透圧比
	組成物	再溶解液量 (ml)		
投与例 1	実施例 1-1-1	0.75	15	1.1
投与例 2	実施例 1-1-2	0.75	14	1.1
投与例 3	実施例 1-1-3	0.75	16	1.1
投与例 4	実施例 1-1-4	0.75	17	1.1
投与例 5	実施例 1-2-1	1.0	15	1.0
投与例 6	実施例 1-1-1	1.5	19	0.6
投与例 7	実施例 1-1-1	0.5	20	1.6
比較投与例 1	生理食塩液	-	12	1.0
比較投与例 2	9%食塩水	-	125	10.0
比較投与例 3	比較例 1-1	1.0	127	10.1
比較投与例 4	比較例 1-2	2.0	81	3.4
比較投与例 5	比較例 1-3	1.0	45	0.2

実験例 3

以下に、実施例で得られた可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤および比較例で得た組成物を 60℃の恒温器に保存し、2週間目に該製剤を再溶解し、その投与用薬剤の会合体生成率(%)を測定した。

会合体生成率の測定法

可溶性トロンボモジュリンの会合体生成率を HPLC 分析ゲルろ過法により測定した。つまり、移動相は 0.1 mmol/L 硫酸ナトリウムを含む 50 mmol/L リン酸塩緩衝液 pH7.3 に調製したものを、カラムは TSK-gel 3000SWXL (東ソー株式会社) を用い、カラム温度は 25℃付近の一定温度で行った。流量は、可溶性トロンボモジュリンの保持時間が 9 分となるように調整した。サンプル溶液は、可溶性トロンボモジュリンの含有量が 1 mg/mL となるように 0.1 mmol/L 硫酸ナトリウムを含む 50 mmol/L リン酸塩緩衝液の移動相を加えて希釈し調製した。この液 0.15 mL を注入した。紫外可視吸光光度計 (測定波長: 280 nm) で可溶性トロンボモジュリンのピーク面積(A)および約 7 から 8 分に現れる会合体のピーク面積(B)を求め、 $100 \times B / (A+B)$ より会合体生成率(%)を算出した。表 3 にその結果を示した。

表 3 から明らかなように、添加剤を加えない場合 (比較例 1 - 3) には会合体の生成率は高く、比較例 1 - 4 から 1 - 11 のように単独で添加する場合に比べて、実施例のように 2 種の添加剤を組み合わせることにより、極めて高い安定性が達成されという顕著な相乗効果が認められた。また、実施例 1 - 19 から 1 - 38 で得られた可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤、および実施例 1 - 1 から 1 - 18 で得られた TME456H または TME456HM を含有する可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤についても表 3 と同様に会合体の生成率を抑える結果が得られた。

従って、本発明の実施例は会合体の生成率が低く、かつ投与するために溶解した場合に疼痛が少ないものであることが確認された。

表 3

	添加剤	添加量 (mmol)	会合体生成率 (%)	
			用いた可溶性トロンボモジュリンの種類 添加量 30 mg	
			TMD123H	TMD123HM
実施例 1-1	L-グルタミン酸 Na 一水和物	0.05	0.32	0.4
	D(-)-マンニトール	0.05		
実施例 1-2	L-グルタミン酸 Na 一水和物	0.075	0.34	0.36
	D(-)-マンニトール	0.075		

実施例 1-3	L-グルタミン酸 Na 一水和物		0.025	0.52	0.53
	D(-)-マンニトール		0.025		
実施例 1-4	L-グルタミン酸 Na 一水和物		0.02	0.36	0.41
	D(-)-マンニトール		0.10		
実施例 1-5	L-グルタミン酸 Na 一水和物		0.07	0.37	0.33
	D(-)-マンニトール		0.02		
実施例 1-6	L-グルタミン酸 Na 一水和物		0.03	0.39	0.37
	D(-)-マンニトール		0.15		
実施例 1-7	L-グルタミン酸 Na 一水和物		0.10	0.43	0.39
	D(-)-マンニトール		0.03		
実施例 1-8	L-グルタミン酸 Na 一水和物		0.05	0.40	0.43
	L-リシン塩酸塩		0.05		
実施例 1-9	L-グルタミン酸 Na 一水和物		0.03	0.32	0.35
	L-リシン塩酸塩		0.07		
実施例 1-10	L-リシン L-グルタミン酸塩二水和物	リシン	0.10	0.39	0.36
		グルタミン酸	0.10		
実施例 1-11	L-リシン L-グルタミン酸塩二水和物	リシン	0.15	0.42	0.45
		グルタミン酸	0.15		
実施例 1-12	L-グルタミン酸 Na 一水和物		0.06	0.55	0.5
	L-アスパラギン酸 Na 一水和物		0.06		
実施例 1-13	L-アスパラギン酸 Na 一水和物		0.05	0.41	0.44
	D(-)-マンニトール		0.05		
実施例 1-14	尿素		0.07	0.59	0.56
実施例 1-15	尿素		0.05	0.42	0.45
	L-グルタミン酸 Na 一水和物		0.05		
実施例 1-16	尿素		0.05	0.53	0.55
	L-アスパラギン酸 Na 一水和物		0.05		
実施例 1-17	L-グルタミン酸 Na 一水和物		0.05	0.34	0.38
	D(-)-マンニトール		0.05		
実施例 1-18	L-アスパラギン酸 Na 一水和物		0.05	0.39	0.42
	D(-)-マンニトール		0.05		
比較例 1-3	添加剤なし		0	3.21	3.51
比較例 1-4	L-グルタミン酸 Na 一水和物		0.025	1.56	1.59
比較例 1-5	D(-)-マンニトール		0.025	1.89	1.97
比較例 1-6	L-グルタミン酸 Na 一水和物		0.05	0.80	0.87
比較例 1-7	D(-)-マンニトール		0.05	0.91	1.16
比較例 1-8	L-グルタミン酸 Na 一水和物		0.075	0.73	0.77
比較例 1-9	D(-)-マンニトール		0.075	0.83	0.92
比較例 1-11	L-アスパラギン酸 Na 一水和物		0.05	0.98	1.05

実験例 4

実施例 1-39-1 から 1-53-1 で得られた可溶性トロンボモジュリン (TMD123H) 高濃度含有製剤またはキット製剤につき、可溶性トロンボモジュリン高濃度含有溶液を調製し、実験例 2 又は実験例 3 と同様の方法で浸透圧比および会合体生成率を求め、表 4 にその結果を示した。

可溶性トロンボモジュリン高濃度含有溶液の調製法

実施例 1-39-1 から 1-41-1 で得られた可溶性トロンボモジュリンが TMD123H である高濃度含有製剤について、注射用水 1 mL を加えて再溶解し、可溶性トロンボモジュリン高濃度含有溶液を得た。また、実施例 1-42-1 から 1-53-1 で得られた可溶性トロンボモジュリンが TMD123H である高濃度含有製剤のキット製剤について、デイスポシリンジ 1 mL (テルモ製) を用いて溶解用水溶液 1 mL を吸引し、バイアルビンに注入して再溶解し、可溶性トロンボモジュリン高濃度含有溶液を得た。

表 4 の結果から明らかなように、実施例で得られた可溶性トロンボモジュリン高濃度含有溶液の浸透圧比がほぼ 1 となり、会合体の生成率を抑える結果が得られた。

また、実施例 1-39-2 から 1-39-4 で得られた可溶性トロンボモジュリンが TTMD123HM または TME456H または TME456HM を含有する可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤またはキット製剤についても、表 4 と同様に浸透圧比がほぼ 1 となり、さらに会合体の生成率を抑える結果が得られた。

従って、本発明の実施例は会合体の生成率が低く、かつ投与するために溶解した場合に疼痛が少なく、例えば筋肉内投与や皮下投与方法の投与方法に採用できることが確認された。

表 4

	浸透圧比	会合体生成率 (%)
実施例 1-39-1	1.0	0.41
実施例 1-40-1	1.0	0.33
実施例 1-41-1	1.0	0.48

実施例 1-42-1	1.0	0.44
実施例 1-43-1	1.2	0.46
実施例 1-44-1	1.2	0.39
実施例 1-45-1	1.0	0.35
実施例 1-46-1	1.2	0.35
実施例 1-47-1	1.2	0.36
実施例 1-48-1	1.0	0.41
実施例 1-49-1	1.1	0.38
実施例 1-50-1	1.1	0.39
実施例 1-51-1	1.0	0.35
実施例 1-52-1	1.1	0.34
実施例 1-53-1	1.1	0.35

実施例 2 - 1

添加剤溶液調製

20 mL のメスフラスコに、Polysorbate 80 (5 mg) を量り入れ (表 5 の組成の欄に記載した添加量の 50 倍量にあたる)、注射用水を加え溶解して 20 mL とした。

試料溶液調製

上記添加剤溶液 4 mL を 15 mL のアシストチューブに入れ、参考例 1 で得られた TMD123H (可溶性トロンボモジュリン濃度: 60 mg/mL) 5 mL を同アシストチューブに入れ (可溶性トロンボモジュリンとして表 5 の添加量の欄に記載の 10 倍量にあたる)、さらに注射用水を加え合わせて 10 mL とし、混合攪拌した。この試料溶液をディスポシリンジ 25 mL (テルモ製) を用い、孔径: 0.22 μ m (MILLEX-GV、ミリポア製) のフィルターを付けてろ過滅菌し、特別に限定しない限りシリコンコーティング未処理の無菌バイアルビン (容量 3 mL、18×33 mm、口内径 9.1 mm、ナミコス製) に 1 mL ずつ分注した。

凍結乾燥工程

ゴム栓 (V5-F8、大協精工製) 半打栓→凍結乾燥→窒素充填→ゴム栓打栓→キャップ巻締めの順で以下の条件にて凍結乾燥工程を行い、1 容器中に可溶性トロンボモジュリン 30 mg、および Polysorbate 80 (0.1 mg) を含む可溶性トロンボ

モジュリン高濃度含有製剤を得た（実施例 2-1-1）。

〔凍結乾燥条件〕

予備冷却（15 分かけて室温から 15℃）→ 本冷却（2 時間かけて 15℃から -45℃）→ 保持（2 時間 -45℃）→ 真空開始（18 時間 -45℃）→ 昇温（20 時間かけて -45℃から 25℃）→ 保持（15 時間 25℃）→ 昇温（1 時間かけて 25℃から 45℃）→ 保持（5 時間 45℃）→ 室温（2 時間かけて 45℃から 25℃）→ 復圧窒素充填（-100 mmHg まで窒素で復圧）→ 打栓 → キャップ巻締め

〔溶解時の減圧度の確認〕

あらかじめ、空のバイアルビンに -100 mmHg でゴム栓打栓、キャップ巻締めを行い、このバイアルビンに注射用水 1 mL を注入した後、U字型真空計（U-400、岡野製作所製）で減圧度を確認したところほぼ大気圧となることを確認した。

実施例 2-1-2、実施例 2-1-3、実施例 2-1-4

同様に、可溶性トロンボモジュリンの種類を変えて実施例 2-1-1 の TMD123H の代わりに TMD123HM（実施例 2-1-2）、TME456H（実施例 2-1-3）、および TME456HM（実施例 2-1-4）を用いて、それぞれ上記の方法にしたがって可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た。

実施例 2-2

実施例 2-1 と同様の方法で、表 5 の組成の欄に記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た（実施例 2-1-1 に準じて、実施例 2-2-1 を調製した）。

実施例 2-3

実施例 2-1 と同様の方法で、表 5 の組成の欄に記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た（前述と同様に、実施例 2-3-1 を調製した）。

実施例 2-4

実施例 2-1 と同様の方法で、表 5 の組成の欄に記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た（前述と同様に、実施例 2-4-1 を調製した）。

実施例 2-5

実施例 2-1 と同様の方法で、表 5 の組成の欄に記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た（前述と同様に、実施例 2-5-1 を調製した）。

実施例 2-6

実施例 2-1 と同様の方法で、表 5 の組成の欄に記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た（前述と同様に、実施例 2-6-1 を調製した）。

実施例 2-7

実施例 2-1 と同様の方法で、表 5 の組成の欄に記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た（前述と同様に、実施例 2-7-1 を調製した）。

実施例 2-8

実施例 2-1 と同様の方法で、表 5 の組成の欄に記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た（前述と同様に、実施例 2-8-1 を調製した）。

実施例 2-9

実施例 2-1 と同様の方法で、表 5 の組成の欄に記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た（前述と同様に、実施例 2-9-1 を調製した）。

実施例 2-10

実施例 2-1 と同様の方法で、表 5 の組成の欄に記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た（前述と同様に、実施例 2-10-1 を調製した）。

実施例 2-11

実施例 2-1 と同様の方法で、表 5 の組成の欄に記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た（前述と同様に、実施例 2-11-1 を調製した）。

実施例 2-12

実施例 2-1 と同様の方法で、表 5 の組成の欄に記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た（前述と同様に、実施例 2-12-1 を調製した）。

実施例 2-13

実施例 2-1 と同様の方法で、表 5 の組成の欄に記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た（前述と同様に、実施例 2-13-1 を調製した）。

実施例 2-14

実施例 2-1 と同様の方法で、表 5 の組成の欄に記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た（前述と同様に、実施例 2-14-1 を調製した）。

実施例 2-15

実施例 2-1 と同様の方法で、表 5 の組成の欄に記載の可溶性トロンボモジュ

リン高濃度含有製剤を得た（前述と同様に、実施例 2-15-1 を調製した）。

実施例 2-16

実施例 2-1 と同様の方法で、表 5 の組成の欄に記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た（前述と同様に、実施例 2-16-1 を調製した）。

実施例 2-17

実施例 2-1 と同様の方法で、表 5 の組成の欄に記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た（前述と同様に、実施例 2-17-1 を調製した）。

実施例 2-18

実施例 2-1 と同様の方法で、表 5 の組成の欄に記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た（前述と同様に、実施例 2-18-1 を調製した）。

実施例 2-19

実施例 2-1 と同様の方法で、表 5 の組成の欄に記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た（前述と同様に、実施例 2-19-1 を調製した）。

実施例 2-20

実施例 2-1 と同様の方法で、表 5 の組成の欄に記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た（前述と同様に、実施例 2-20-1 を調製した）。

実施例 2-21

実施例 2-1 と同様の方法で、表 5 の組成の欄に記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た（前述と同様に、実施例 2-21-1 を調製した）。

実施例 2-22

実施例 2-1 と同様の方法で、表 5 の組成の欄に記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た（前述と同様に、実施例 2-22-1 を調製した）。

実施例 2-23

バイアルビンを 0.1w/v%のシリコーンコーティングバイアルビン（3 mL、18×33 mm、口内径 9.1 mm、ナミコス製）とする以外は実施例 2-18 と同様の方法で、表 5 の組成の欄に記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た（前述と同様に、実施例 2-23-1 を調製した）。

実施例 2-24

バイアルビンを 0.5 w/v%のシリコーンコーティングバイアルビン（3 mL、18×

33 mm、口内径 9.1 mm、ナミコス製）とする以外は実施例 2-18 と同様の方法で、表 5 の組成の欄に記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た（前述と同様に、実施例 2-24-1 を調製した）。

実施例 2-25

バイアルビンに 1.0 w/v% のシリコーンコーティングバイアルビン（3 mL、18×33 mm、口内径 9.1 mm、ナミコス製）とする以外は実施例 2-18 と同様の方法で、表 5 の組成の欄に記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た（前述と同様に、実施例 2-25-1 を調製した）。

実施例 2-26

バイアルビンに 2.0 w/v% のシリコーンコーティングバイアルビン（3 mL、18×33 mm、口内径 9.1 mm、ナミコス製）とする以外は実施例 2-18 と同様の方法で、表 5 の組成の欄に記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た（前述と同様に、実施例 2-26-1 を調製した）。

実施例 2-27

実施例 2-18 と同様の方法で、表 5 の組成の欄に記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た（前述と同様に、実施例 2-27-1 を調製した）。また、下記の方法により、該製剤を再溶解する際の減圧度が -200 mmHg となるように減圧度を初期減圧度まで減圧した。

真空ポンプ（LV-140、日東工器株式会社製）の吸引に際して、U字型真空計（U-400、岡野製作所製）にて減圧度を確認した。あらかじめ、空のバイアルビンにゴム栓とキャップをし、ポンプに接続した注射針を刺し、真空ポンプのスイッチを入れて容器内を減圧し（初期減圧度）、注射用水 1 mL をバイアル内に注入した直後の減圧度が -200 mmHg となる初期減圧度を求めた。各製剤を初期減圧度になるまで減圧した。

実施例 2-28

バイアルビンに 2.0 w/v% のシリコーンコーティングバイアルビン（3 mL、18×33 mm、口内径 9.1 mm、ナミコス製）とする以外は実施例 2-18 と同様の方法で、表 5 の組成の欄に記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た（前述と同様に、実施例 2-28-1 を調製した）。また、実施例 2-27 と同様に、該製剤を

再溶解する際の減圧度が-200 mmHg となるように初期減圧度を調整した。

実施例 2-29

バイアルビン を 2.0 w/v% のシリコーンコーティングバイアルビン (3 mL、18×33 mm、口内径 9.1 mm、ナミコス製) とする以外は実施例 2-11 と同様の方法で、表 5 の組成の欄に記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た (前述と同様に、実施例 2-29-1 を調製した)。また、実施例 2-27 と同様に、該製剤を再溶解する際の減圧度が-200 mmHg となるように初期減圧度を調整した。

実施例 2-30

バイアルビン を 2.0w/v% のシリコーンコーティングバイアルビン (3 mL、18×33 mm、口内径 9.1mm、ナミコス製) とする以外は実施例 2-15 と同様の方法で、表 5 の組成の欄に記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤を得た (前述と同様に、実施例 2-30-1 を調製した)。また、実施例 2-27 と同様に、該製剤を再溶解する際の減圧度が-200 mmHg となるように初期減圧度を調整した。

実施例 2-31

実施例 2-14 の、添加剤溶液で Polysorbate 80 を添加しない以外は同様の方法で得た表 5 の組成の欄に記載の可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤と、溶解用水溶液として注射用水 1 mL にベンジルアルコールを 10 mg 含有する溶液を 1 mL 無菌的に充填してなるアンプルとを組み合わせしめた可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤のキット製剤を得た (前述と同様に、実施例 2-31-1 を調製した)。

実施例 2-32

実施例 2-14 の、添加剤溶液で Polysorbate 80 を添加しない以外は同様の方法で得た表 5 の組成の欄に記載の可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤と、溶解用水溶液として注射用水 1 mL にベンジルアルコールを 5 mg 含有する溶液を 1 mL 無菌的に充填してなるアンプルとを組み合わせしめた可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤のキット製剤を得た (前述と同様に、実施例 2-32-1 を調製した)。

実施例 2-33

実施例 2-14 の、添加剤溶液で Polysorbate 80 を添加しない以外は同様の方法

で得た表 5 の組成の欄に記載の可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤と、溶解用水溶液として注射用水 1 mL にクロブタノールを 5 mg 含有する溶液を 1 mL 無菌的に充填してなるアンプルとを組み合わせしめた可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤のキット製剤を得た（前述と同様に、実施例 2-33-1 を調製した）。

実施例 2-34

実施例 2-14 の、添加剤溶液で Polysorbate 80 を添加しない以外は同様の方法で得た表 5 の組成の欄に記載の可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤と、溶解用水溶液として注射用水 1 mL にクロブタノールを 2.5 mg 含有する溶液を 1 mL 無菌的に充填してなるアンプルとを組み合わせしめた可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤のキット製剤を得た（前述と同様に、実施例 2-34-1 を調製した）。

実施例 2-35

実施例 2-1 の試料溶液調製で試料溶液を無菌バイアルビンに分注する代わりに 2 室式シリンジ（アルテ製）の 1 室に 1 mL ずつ分注した。これらを、ミドル栓半打栓→凍結乾燥→窒素充填→ミドル栓打栓の順で凍結乾燥工程（凍結乾燥条件は実施例 2-1 と同様）を行った。次にもう 1 室側に注射用水 1.0 mL を無菌的に充填し、ゴム栓で封印したのち、プランジャーロッドを取りつけ可溶性トロンボモジュリン（TMD123H）高濃度含有製剤のキット製剤（実施例 2-35-1）を得た。

比較例 2-1

試料溶液調製

参考例 1 で得られた TMD123H（可溶性トロンボモジュリン濃度：60 mg/mL）を 1.67 mL（可溶性トロンボモジュリンとして表 5 の添加量の欄に記載の 10 倍量にあたる 100 mg を含有する）を 15 mL アシストチューブに入れ、さらに注射用水を加え合わせて 10 mL とし、混合攪拌した。この試料溶液をディスポシリンジ 25 mL（テルモ製）を用い、孔径：0.22 μ m（MILLEX-GV、ミリポア製）のフィルターを付けてろ過滅菌し、シリコーンコーティング未処理の無菌バイアルビン（容量 3 mL、18×33 mm、口内径 9.1 mm、ナミコス製）に 1 mL ずつ分注した。

凍結乾燥工程

ゴム栓半打栓（V5-F8、大協精工製）→凍結乾燥→窒素充填→ゴム栓打栓→キャップ巻締めの順で実施例 2-1 記載の条件にて凍結乾燥工程を行い、表 5 の組成の欄に記載の組成物を得た。

比較例 2-2

比較例 2-1 と同様の方法で、表 5 の組成の欄に記載の組成物を得た。

比較例 2-3

比較例 2-1 と同様の方法で、表 5 の組成の欄に記載の組成物を得た。（比較例 2-3-1）

同様に、可溶性トロンボモジュリンの種類を変えて比較例 2-3-1 の TMD123H の代わりに TMD123HM（比較例 2-3-2）、TME456H（比較例 2-3-3）、および TME456HM（比較例 2-3-4）を用いて、それぞれ上記の方法にしたがって組成物を得た。

比較例 2-4

添加剤溶液調製

20 mL のメスフラスコに、L-グルタミン酸ナトリウム水和物 500 mg、D(-)-マンニトール 500 mg を量り入れ（表 5 の組成の欄に記載した添加剤量のそれぞれ 50 倍量にあたる）、注射用水を加え溶解して 20 mL とした。

試料溶液調製

上記添加剤溶液 4 mL を 15 mL のアシストチューブに入れ、参考例 1 で得られた TMD123H（可溶性トロンボモジュリン濃度：60 mg/mL）を 5 mL（可溶性トロンボモジュリンとして表 5 の添加量の欄に記載の 10 倍量にあたる 300 mg を含有する）を同アシストチューブに入れ、さらに注射用水を加え合わせて 10 mL とし、混合攪拌した。この試料溶液をディスポシリンジ 25 mL（テルモ製）を用い、孔径：0.22 μ m（MILLEX-GV、ミリポア製）のフィルターを付けてろ過滅菌し、シリコーンコーティング未処理の無菌バイアルビン（容量 3 mL、18×33 mm、口内径 9.1 mm、ナミコス製）に 1 mL ずつ分注した。

凍結乾燥工程

ゴム栓半打栓（V5-F8、大協精工製）→凍結乾燥→窒素充填→ゴム栓打栓→キャップ巻締めの順で実施例 2-1 記載の条件にて凍結乾燥工程を行い、表 5 の組成の欄に記載の組成物を得た。

比較例 2-5

比較例 2-4 と同様の方法で、表 5 の組成の欄に記載の組成物を得た。

比較例 2-6

比較例 2-4 と同様の方法で、表 5 の組成の欄に記載の組成物を得た。

実験例 4

表 5 に示す実施例 2-1 から実施例 2-34 で得られた可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤またはキット製剤、および比較例 2-1 から比較例 2-6 で得られた組成物を表 5 の溶解用水溶液の欄に記載した溶解用水溶液 1 mL で再溶解し、その時の起泡抑制効果を下記の濁度測定により透過率で求め、その代表的な結果を表 5 に示した。

濁度の測定方法

測定試料となる凍結乾燥製剤のゴム栓中央に、溶解用水溶液 1 mL を吸引した注射用シリンジ（ツベルクリン用 1 mL、注射針：26G 0.45×13 mm、テルモ製）を刺し、0.1 mL/秒の速度で溶解用水溶液を凍結乾燥物中央に注入する。注射用シリンジを刺したまま静置する。注入終了の 30 秒後にバイアル瓶を逆さまにしてシリンジで可溶性トロンボモジュリン高濃度含有溶液を約 0.8 mL 吸引する。この吸引した溶解液を石英セル（ブラックセル、光路長：10 mm、光路幅：2 mm、ジーエルサイエンス製）にセル壁を伝わらせて静かに注ぐ。素早く紫外可視分光光度計（UV-2500PC、島津製作所製）を用いて、650 nm の透過率（事前に溶解用水溶液のみで 650 nm における透過率 100%を調整しておく）を測定する。凍乾物溶解液をバイアル瓶から吸引して透過率を測定するまでの時間は 15 秒間とする。なお、特別に記載しない限り、透過率は 3 回の測定値の平均として表される。

表 5

実施例 及び 比較例	組成	添加量 (mg)	溶解用 水溶液 (*1)	シリコーン コーテ ィング (*2)	減圧度 (*3)	透過率 (%)
実施例 2-1-1	TMD123H Polysorbate 80	30 0.1	W	—	—	99.5
実施例 2-1-2	TMD123HM Polysorbate 80	30 0.1	W	—	—	99.3

実施例 2-1-3	TME456H Polysorbate 80	30 0.1	W	—	—	99.5
実施例 2-1-4	TME456HM Polysorbate 80	30 0.1	W	—	—	99.4
実施例 2-2-1	TMD123H Polysorbate 80	10 0.01	W	—	—	99.5
実施例 2-3-1	TMD123H Polysorbate 80	15 0.015	W	—	—	99.4
実施例 2-4-1	TMD123H Polysorbate 80	17 0.017	W	—	—	99.3
実施例 2-5-1	TMD123H Polysorbate 80	20 0.02	W	—	—	99.4
実施例 2-6-1	TMD123H Polysorbate 80	25 0.025	W	—	—	99.3
実施例 2-7-1	TMD123H Polysorbate 80	30 0.03	W	—	—	99.4
実施例 2-8-1	TMD123H Polysorbate 80	30 0.05	W	—	—	99.5
実施例 2-9-1	TMD123H Polysorbate 80	30 0.2	W	—	—	99.8
実施例 2-10-1	TMD123H Polysorbate 80	30 0.5	W	—	—	100.0
実施例 2-11-1	TMD123H L-アルギニン塩酸塩 Polysorbate 80	30 10 0.1	W	—	—	99.2
実施例 2-12-1	TMD123H D-トレハロース二水和物 Polysorbate 80	30 10 0.1	W	—	—	98.8
実施例 2-13-1	TMD123H L-アルギニン塩酸塩 D-トレハロース二水和物 Polysorbate 80	30 10 10 0.1	W	—	—	98.7
実施例 2-14-1	TMD123H L-グルタミン酸 Na 一水和物 D-トレハロース二水和物 Polysorbate 80	30 10 10 0.1	W	—	—	98.8
実施例 2-15-1	TMD123H L-グルタミン酸 Na 一水和物 D(-)-マンニトール Polysorbate 80	30 10 10 0.1	W	—	—	99.2
実施例 2-16-1	TMD123H L-アスパラギン酸 Na 一水和物 D(-)-マンニトール Polysorbate 80	30 10 10 0.1	W	—	—	99.3
実施例 2-17-1	TMD123H L-グルタミン酸 D(-)-マンニトール 水酸化ナトリウム Polysorbate 80	30 10 10 2.8 0.1	W	—	—	99.1

実施例 2-18-1	TMD123H L-グルタミン酸 Na 一水和物 D(-)-マンニトール Polysorbate 20	30 10 10 0.1	W	—	—	97.7
実施例 2-19-1	TMD123H L-グルタミン酸 Na 一水和物 D(-)-マンニトール Poloxamer 188	30 10 10 0.1	W	—	—	98.7
実施例 2-20-1	TMD123H L-グルタミン酸 Na 一水和物 D(-)-マンニトール Polyoxyethylene (25) lauryl ether	30 10 10 0.1	W	—	—	97.2
実施例 2-21-1	TMD123H L-グルタミン酸 Na 一水和物 D(-)-マンニトール Polyoxyl 40 stearate	30 10 10 0.1	W	—	—	98.1
実施例 2-22-1	TMD123H L-グルタミン酸 Na 一水和物 D(-)-マンニトール HCO-60	30 10 10 0.1	W	—	—	97.8
実施例 2-23-1	TMD123H L-グルタミン酸 Na 一水和物 D(-)-マンニトール Polysorbate 20	30 10 10 0.1	W	0.1%	—	98.0
実施例 2-24-1	TMD123H L-グルタミン酸 Na 一水和物 D(-)-マンニトール Polysorbate 20	30 10 10 0.1	W	0.5%	—	98.3
実施例 2-25-1	TMD123H L-グルタミン酸 Na 一水和物 D(-)-マンニトール Polysorbate 20	30 10 10 0.1	W	1.0%	—	98.6
実施例 2-26-1	TMD123H L-グルタミン酸 Na 一水和物 D(-)-マンニトール Polysorbate 20	30 10 10 0.1	W	2.0%	—	99.1
実施例 2-27-1	TMD123H L-グルタミン酸 Na 一水和物 D(-)-マンニトール Polysorbate 20	30 10 10 0.1	W	—	+	98.2
実施例 2-28-1	TMD123H L-グルタミン酸 Na 一水和物 D(-)-マンニトール Polysorbate 20	30 10 10 0.1	W	2.0%	+	99.3
実施例 2-29-1	TMD123H L-アルギニン塩酸塩 Polysorbate 80	30 10 0.1	W	2.0%	+	99.7

実施例 2-30-1	TMD123H	30	W	2.0%	+	99.5
	L-グルタミン酸 Na 一水和物	10				
	D(-)-マンニトール	10				
	Polysorbate 80	0.1				
実施例 2-31-1	TMD123H	30	Be10	—	—	98.2
	L-グルタミン酸 Na 一水和物	10				
	D-トレハロース二水和物	10				
実施例 2-32-1	TMD123H	30	Be05	—	—	97.9
	L-グルタミン酸 Na 一水和物	10				
	D-トレハロース二水和物	10				
実施例 2-33-1	TMD123H	30	Ch50	—	—	98.0
	L-グルタミン酸 Na 一水和物	10				
	D-トレハロース二水和物	10				
実施例 2-34-1	TMD123H	30	Ch25	—	—	97.7
	L-グルタミン酸 Na 一水和物	10				
	D-トレハロース二水和物	10				
比較例 2-1	TMD123H	10	W	—	—	90.5
比較例 2-2	TMD123H	15	W	—	—	84.9
比較例 2-3-1	TMD123H	30	W	—	—	79.7
比較例 2-4	TMD123H	30	W	—	—	62.2
	L-グルタミン酸 Na 一水和物	10				
	D(-)-マンニトール	10				
比較例 2-5	TMD123H	30	W	—	—	57.7
	L-グルタミン酸 Na 一水和物	10				
	D(-)-マンニトール	10				
	ラウリル硫酸ナトリウム	0.1				
比較例 2-6	TMD123H	30	W	—	—	82.7
	L-グルタミン酸 Na 一水和物	10				
	D(-)-マンニトール	10				
	塩化ベンザルコニウム	0.1				

表中の記号の説明

* 1 : 溶解用水溶液

W ; 注射用蒸留水 1mL

Be10 ; 注射用蒸留水 1mL + ベンジルアルコール 10mg

Be05 ; 注射用蒸留水 1mL + ベンジルアルコール 5mg

Ch50 ; 注射用蒸留水 1mL + クロロブタノール 5mg

Ch25 ; 注射用蒸留水 1mL + クロロブタノール 2.5mg

* 2 : シリコーンコーティング

— ; 未処理のバイアル

0.1% ; 0.1w/v%のシリコーンコーティングバイアル

0.5% ; 0.5w/v%のシリコーンコーティングバイアル

1.0% ; 1.0w/v%のシリコーンコーティングバイアル

2.0% ; 2.0w/v%のシリコーンコーティングバイアル

* 3 : 減圧度

- －；溶解の際に実質的に減圧状態となっていない
- ＋；溶解の際に-200mmHg の減圧状態となっている

表 5 の透過率(%) の欄に示した結果から、可溶性トロンボモジュリンが 10 mg/mL 以上の高濃度製剤において非イオン性界面活性剤を含有する場合には、比較例 2-3-1 に示した非イオン性界面活性剤を含有しない場合及び陰イオン性界面活性剤（比較例 2-5）や陽イオン性界面活性剤（比較例 2-6）を添加した場合と比べて透過率が高く、気泡の発生を抑制していることが確認された。

なお、比較例 2-3-2 から比較例 2-3-4 における TMD123HM、TME456H または TME456HM を含有する各凍結乾燥組成物の透過率は、比較例 2-3-1 と同程度であった。

また、実施例 2-35-1 で得た 2 室式シリンジキット製剤については、プランジャーロッドを半打栓位置まで押し込み（約 0.1 mL/秒の一定速度）、凍結乾燥物のある 1 室に注射用水を注入後から 30 秒後に、さらにプランジャーロッドを押し込み、可溶性トロンボモジュリン高濃度含有溶液を石英セルにセル壁を伝わらせて静かに注ぎ、前述の方法に従い透過率を求めたが、表 5 と同様に高い透過率を示した。

以上より、可溶性トロンボモジュリン高濃度含有溶液に起泡抑制添加剤として、非イオン性界面活性剤、ベンジルアルコール、クロロブタノールを含有した製剤が気泡の発生を抑制することを確認し、また、該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤を溶解する際の容器の内壁がシリコーンでコーティングされていること、または該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤を溶解する際の容器内圧力が減圧状態であることも気泡の発生を抑制することが確認された。

実験例 5

表 1 に示す実施例 1-1-1 から実施例 1-38-1 で得られた可溶性トロンボモジュリン（TMD123H）含有凍結乾燥製剤と、表 6 に示す溶解用水溶液と組み合わせたキット製剤を作り、上記実験例 4 と同様の方法で、起泡抑制効果を確認したところ、気泡の発生を抑制していることが確認された。

表 6

溶解用水溶液	組成	容量
溶解液 1	注射用水	1 mL
	ベンジルアルコール	10mg
溶解液 2	注射用水	1 mL
	クロロブタノール	5mg
溶解液 3	注射用水	1 mL
	Polysorbate 80	0.1mg
溶解液 4	注射用水	1 mL
	Poloxamer 188	0.1mg
溶解液 5	注射用水	1 mL
	Polyoxyethylene (25) lauryl ether	0.1mg

産業上の利用可能性

本発明によると、高濃度の可溶性トロンボモジュリン含有溶液において生ずる起泡を抑制することができ、臨床上有用である。また、そのような起泡の発生を抑制することのできる可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤およびキット製剤を提供できる。

請 求 の 範 囲

1. 有効成分として可溶性トロンボモジュリンを含有する可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤を溶解して、10 mg/mL 以上の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有溶液を調製するに際し、(a)非イオン性界面活性剤、ベンジルアルコール、クロロブタノールからなる群より選ばれる少なくとも一種の化合物を存在せしめること、(b)該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤を溶解する際の容器の内壁がシリコーンでコーティングされていること、または(c)該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤を溶解する際の容器内圧力が減圧状態であること、の少なくともいずれかを特徴とする可溶性トロンボモジュリン高濃度含有溶液の起泡抑制方法。
2. 該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤を溶解して、10 mg/mL 以上の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有溶液を調製するに際し、非イオン性界面活性剤、ベンジルアルコール、クロロブタノールからなる群より選ばれる少なくとも一種の化合物を存在せしめることを特徴とする請求項1に記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有溶液の起泡抑制方法。
3. 該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤中に、非イオン性界面活性剤、ベンジルアルコール、クロロブタノールからなる群より選ばれる少なくとも一種の化合物が存在せしめられていることを特徴とする請求項1または2に記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有溶液の起泡抑制方法。
4. 該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤を溶解するための溶解用水溶液中に、非イオン性界面活性剤、ベンジルアルコール、クロロブタノールからなる群より選ばれる少なくとも一種の化合物が存在せしめられていることを特徴とする請求項1－3のいずれかに記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有溶液の起泡抑制方法。
5. 該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤を溶解する際の容器の内壁がシリコーンでコーティングされていることを特徴とする請求項1－4のいずれかに記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有溶液の起泡抑制方法。
6. 該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤を溶解する際の容器内圧力

が減圧状態であることを特徴とする請求項 1－5 のいずれかに記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有溶液の起泡抑制方法。

7. 該可溶性トロンボモジュリン高濃度含有溶液が、17 mg/mL 以上の可溶性トロンボモジュリン濃度であることを特徴とする請求項 1－6 のいずれかに記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有溶液の起泡抑制方法。

8. 該可溶性トロンボモジュリン高濃度含有溶液が、25 mg/mL 以上の可溶性トロンボモジュリン濃度であることを特徴とする請求項 1－6 のいずれかに記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有溶液の起泡抑制方法。

9. 溶解して調製された可溶性トロンボモジュリン高濃度含有溶液の液量が、0.1 mL から 2 mL であり、その溶解時の浸透圧比が 0.5 から 2.0 であることを特徴とする請求項 1－8 のいずれかに記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有溶液の起泡抑制方法。

10. 該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤が、(1) グルタミン酸またはその塩、およびマンニトールの 2 種を含む、(2) グルタミン酸またはその塩、およびリシンまたはその塩の 2 種を含む、(3) グルタミン酸またはその塩、およびアスパラギン酸またはその塩の 2 種を含む、または(4) アスパラギン酸またはその塩、およびマンニトールの 2 種を含む、のいずれかの組み合わせを含有せしめられており、さらに該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤中に、非イオン性界面活性剤、ベンジルアルコール、クロロブタノールからなる群より選ばれる少なくとも一種の化合物が存在せしめられているか、および/または該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤を溶解するための溶解用水溶液中に、非イオン性界面活性剤、ベンジルアルコール、クロロブタノールからなる群より選ばれる少なくとも一種の化合物が存在せしめられていることを特徴とする請求項 1－9 のいずれかに記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有溶液の起泡抑制方法。

11. 該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤が、(1) 尿素、または(2) 尿素およびアミノ酸、のいずれかを含有せしめられており、さらに該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤中に、非イオン性界面活性剤、ベンジルアルコール、クロロブタノールからなる群より選ばれる少なくとも一種の化合物が

存在せしめられているか、および／または該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤を溶解するための溶解用水溶液中に、非イオン性界面活性剤、ベンジルアルコール、クロロブタノールからなる群より選ばれる少なくとも一種の化合物が存在せしめられていることを特徴とする請求項 1－9 のいずれかに記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有溶液の起泡抑制方法。

12. 該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤が、アルギニン、グルタミン酸、プロリン、セリン、グリシン、ヒスチジン、アスパラギン、リジン、フェニルアラニンおよびバリン、またはそれらの塩、トレハロース、ラクトース、およびスクロースからなる群より選ばれた一種または二種を含有せしめられており、さらに該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤中に、非イオン性界面活性剤、ベンジルアルコール、クロロブタノールからなる群より選ばれる少なくとも一種の化合物が存在せしめられているか、および／または該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤を溶解するための溶解用水溶液中に、非イオン性界面活性剤、ベンジルアルコール、クロロブタノールからなる群より選ばれる少なくとも一種の化合物が存在せしめられていることを特徴とする請求項 1－8 のいずれかに記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有溶液の起泡抑制方法。

13. 該非イオン性界面活性剤が、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンーポリオキシプロピレン共重合体、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油からなる群より選ばれるいずれか少なくとも一種の化合物であることを特徴とする請求項 1－12 のいずれかに記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有溶液の起泡抑制方法。

14. 該非イオン性界面活性剤の存在量が、可溶性トロンボモジュリン 10 mg に対して 0.01 mg 以上であることを特徴とする請求項 1－13 のいずれかに記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有溶液の起泡抑制方法。

15. 該可溶性トロンボモジュリンが、水に 30 mg/mL 以上の濃度として溶解可能なペプチドであることを特徴とする請求項 1－14 のいずれかに記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有溶液の起泡抑制方法。

16. 該可溶性トロンボモジュリンが、以下の配列の 1 つを含有するペプチド

であり、トロンビンのプロテインCの活性化を促進する作用を有し、且つ界面活性剤の非存在下で溶解し得るものであることを特徴とする請求項1-15のいずれかに記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有溶液の起泡抑制方法。

- i) 配列表配列番号3の19-132のアミノ酸配列。
- ii) 配列表配列番号7の19-132のアミノ酸配列。
- iii) 上記 i)、または ii)のアミノ酸配列に、少なくとも1つ以上のアミノ酸の付加、欠失、または置換されたアミノ酸配列。

17. 該可溶性トロンボモジュリンが、配列表配列番号4または8の55-396の塩基配列の相補DNAに対してストリンジェントな条件下にてハイブリダイズできるDNAによりコードされ得るペプチドであり、トロンビンのプロテインCの活性化を促進する作用を有し、且つ界面活性剤の非存在下で溶解し得ることのできることを特徴とする請求項1-15のいずれかに記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有溶液の起泡抑制方法。

18. 可溶性トロンボモジュリンが、以下の配列の1つを含有するペプチドであり、トロンビンのプロテインCの活性化を促進する作用を有し、且つ界面活性剤の非存在下で溶解し得るものであることを特徴とする請求項1-15のいずれかに記載の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有溶液の起泡抑制方法。

- i) 配列表配列番号1の19-516のアミノ酸配列。
- ii) 配列表配列番号5の19-516のアミノ酸配列。
- iii) 上記 i)、または ii)のアミノ酸配列に、少なくとも1つ以上のアミノ酸の付加、欠失、または置換されたアミノ酸配列。

19. 有効成分として可溶性トロンボモジュリンを含有する可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤を溶解して、20 mg/mL以上の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有溶液を調製するに際して用いられるものであって、非イオン性界面活性剤、ベンジルアルコール、クロロブタノールからなる群より選ばれる少なくとも一種の化合物を有効成分とする可溶性トロンボモジュリン高濃度含有溶液の起泡抑制剤。

20. 有効成分として可溶性トロンボモジュリンを含有する可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤、または該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製

剤とその溶解用水溶液とを組み合わせしめたキット製剤であって、該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤が 10 mg/mL 以上の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有溶液を調製されるためのものであって、且つ(a) 該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤中に、非イオン性界面活性剤、ベンジルアルコール、クロロブタノールからなる群より選ばれる少なくとも一種の化合物が存在せしめられているか、および/または該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤の溶解用水溶液中に、非イオン性界面活性剤、ベンジルアルコール、クロロブタノールからなる群より選ばれる少なくとも一種の化合物が存在せしめられていること、(b) 該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤を溶解する際の容器の内壁がシリコーンでコーティングされていること、または(c) 該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤を溶解する際の容器内圧力が減圧状態であること、の少なくともいずれかを特徴とする可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤、またはそのキット製剤。

21. 該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤、または該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤とその溶解用水溶液とを組み合わせしめたキット製剤であって、該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤が 10 mg/mL 以上の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有溶液を調製されるためのものであって、且つ該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤中に、非イオン性界面活性剤、ベンジルアルコール、クロロブタノールからなる群より選ばれる少なくとも一種の化合物が存在せしめられているか、および/または該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤の溶解用水溶液中に、非イオン性界面活性剤、ベンジルアルコール、クロロブタノールからなる群より選ばれる少なくとも一種の化合物が存在せしめられていることを特徴とする請求項20に記載の可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤、またはそのキット製剤。

22. 該可溶性トロンボモジュリン高濃度含有溶液が、25 mg/mL 以上の可溶性トロンボモジュリン濃度であることを特徴とする請求項20または21に記載の可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤、またはそのキット製剤。

23. 該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤が、(1) グルタミン酸またはその塩、およびマンニトールの2種を含む、(2) グルタミン酸またはその塩、

およびリシンまたはその塩の 2 種を含む、(3) グルタミン酸またはその塩、およびアスパラギン酸またはその塩の 2 種を含む、または(4) アスパラギン酸またはその塩、およびマンニトールの 2 種を含む、のいずれかの組み合わせを含有せしめ、且つ該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤が、0.1 mL から 2 mL の溶解用水溶液に溶解し得て、10 mg/mL 以上の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有溶液を調製でき、その溶解時の浸透圧比が 0.5 から 2.0 であることを特徴とする請求項 20-22 のいずれかに記載の可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤。

24. 該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤が、(1) グルタミン酸またはその塩、およびマンニトールの 2 種を含む、(2) グルタミン酸またはその塩、およびリシンまたはその塩の 2 種を含む、(3) グルタミン酸またはその塩、およびアスパラギン酸またはその塩の 2 種を含む、または(4) アスパラギン酸またはその塩、およびマンニトールの 2 種を含む、のいずれかの組み合わせを含有せしめ、且つ該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤が、0.1 mL から 2 mL の溶解用水溶液に溶解し得て、10 mg/mL 以上の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有溶液を調製でき、その溶解時の浸透圧比が 0.5 から 2.0 であり、且つ該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤中に、非イオン性界面活性剤、ベンジルアルコール、クロロブタノールからなる群より選ばれる少なくとも一種の化合物が存在せしめられていることを特徴とする請求項 20-22 のいずれかに記載の可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤。

25. 該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤が、(1) グルタミン酸またはその塩、およびマンニトールの 2 種を含む、(2) グルタミン酸またはその塩、およびリシンまたはその塩の 2 種を含む、(3) グルタミン酸またはその塩、およびアスパラギン酸またはその塩の 2 種を含む、または(4) アスパラギン酸またはその塩、およびマンニトールの 2 種を含む、のいずれかの組み合わせを含有せしめ、且つ該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤が、0.1 mL から 2 mL の溶解用水溶液に溶解し得て、10 mg/mL 以上の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有溶液を調製でき、その溶解時の浸透圧比が 0.5 から 2.0 であることを特徴とし、さらに(a)該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤の溶解用水溶液中に、

非イオン性界面活性剤、ベンジルアルコール、クロロブタノールからなる群より選ばれる少なくとも一種の化合物が存在せしめられていること、(b)該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤を溶解する際の容器の内壁がシリコーンでコーティングされていること、または(c)該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤を溶解する際の容器内圧力が減圧状態であること、の少なくともいずれかを特徴とする請求項 20-22 のいずれかに記載の可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤のキット製剤。

26. 該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤が、(1) グルタミン酸またはその塩、およびマンニトールの 2 種を含む、(2) グルタミン酸またはその塩、およびリシンまたはその塩の 2 種を含む、(3) グルタミン酸またはその塩、およびアスパラギン酸またはその塩の 2 種を含む、または(4) アスパラギン酸またはその塩、およびマンニトールの 2 種を含む、のいずれかの組み合わせを含有せしめ、且つ該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤が、0.1 mL から 2 mL の溶解用水溶液に溶解し得て、10 mg/mL 以上の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有溶液を調製でき、その溶解時の浸透圧比が 0.5 から 2.0 であり、且つ(a)該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤中に、非イオン性界面活性剤、ベンジルアルコール、クロロブタノールからなる群より選ばれる少なくとも一種の化合物が存在せしめられており、さらに該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤の溶解用水溶液中に、非イオン性界面活性剤、ベンジルアルコール、クロロブタノールからなる群より選ばれる少なくとも一種の化合物が存在せしめられていること、(b)該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤を溶解する際の容器の内壁がシリコーンでコーティングされていること、または(c)該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤を溶解する際の容器内圧力が減圧状態であること、の少なくともいずれかを特徴とする請求項 20-22 のいずれかに記載の可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤のキット製剤。

27. 該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤の溶解用水溶液が、0.1 mL から 2 mL であり、その溶解時の浸透圧比が 0.5 から 2.0 であることを特徴とする請求項 20-22、25 または 26 のいずれかに記載の可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤のキット製剤。

28. 該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤、またはそのキット製剤が、皮下または筋肉内注射用の製剤であることを特徴とする請求項20-27のいずれかに記載の可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤、またはそのキット製剤。

29. 非イオン性界面活性剤が、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレン共重合体、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油からなる群より選ばれるいずれか少なくとも一種の化合物であることを特徴とする請求項20、21、または24-26のいずれかに記載の可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤、またはそのキット製剤。

30. 該非イオン性界面活性剤の存在量が、可溶性トロンボモジュリン 10 mg に対して 0.01 mg 以上であることを特徴とする請求項20、21、24-26、または29のいずれかに記載の可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤、またはそのキット製剤。

31. 該可溶性トロンボモジュリンが、水に 30 mg/mL 以上の濃度として溶解可能なペプチドであることを特徴とする請求項20-30のいずれかに記載の可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤、またはそのキット製剤。

32. 該可溶性トロンボモジュリンが、以下の配列の1つを含有するペプチドであり、トロンビンのプロテインCの活性化を促進する作用を有し、且つ界面活性剤の非存在下で溶解し得るものであることを特徴とする請求項20-31のいずれかに記載の可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤、またはそのキット製剤。

i) 配列表配列番号3の19-132のアミノ酸配列。

ii) 配列表配列番号7の19-132のアミノ酸配列。

iii) 上記 i)、または ii) のアミノ酸配列に、少なくとも1つ以上のアミノ酸の付加、欠失、または置換されたアミノ酸配列。

33. 該可溶性トロンボモジュリンが、配列表配列番号4または8の55-396の塩基配列の相補 DNA に対してストリンジェントな条件下にてハイブリダイズできる DNA によりコードされ得るペプチドであり、トロンビンのプロテインCの活

性化を促進する作用を有し、且つ界面活性剤の非存在下で溶解し得ることのできることを特徴とする請求項 20-31 のいずれかに記載の可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤、またはそのキット製剤。

34. 可溶性トロンボモジュリンが、以下の配列の 1 つを含有するペプチドであり、トロンビンのプロテイン C の活性化を促進する作用を有し、且つ界面活性剤の非存在下で溶解し得るものであることを特徴とする請求項 20-31 のいずれかに記載の可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤、またはそのキット製剤。

- i) 配列表配列番号 1 の 19-516 のアミノ酸配列。
- ii) 配列表配列番号 5 の 19-516 のアミノ酸配列。
- iii) 上記 i)、または ii) のアミノ酸配列に、少なくとも 1 つ以上のアミノ酸の付加、欠失、または置換されたアミノ酸配列。

35. 有効成分として可溶性トロンボモジュリンを含有する可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤における可溶性トロンボモジュリンの安定化方法であって、(1) グルタミン酸またはその塩、およびマンニトールの 2 種を含む、(2) グルタミン酸またはその塩、およびリシンまたはその塩の 2 種を含む、(3) グルタミン酸またはその塩、およびアスパラギン酸またはその塩の 2 種を含む、または(4) アスパラギン酸またはその塩、およびマンニトールの 2 種を含む、のいずれかの組み合わせを含有せしめ、且つ該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤が、0.1 mL から 2 mL の溶解用水溶液に溶解し得て、10 mg/mL 以上の可溶性トロンボモジュリン高濃度含有溶液を調製でき、その溶解時の浸透圧比が 0.5 から 2.0 であることを特徴とする可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤における可溶性トロンボモジュリンの安定化方法。

36. 該可溶性トロンボモジュリン含有凍結乾燥製剤中に、さらに非イオン性界面活性剤を存在せしめることを特徴とする請求項 35 に記載の可溶性トロンボモジュリンの安定化方法。

37. 非イオン性界面活性剤が、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレン共重合体、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレン硬

化ヒマシ油からなる群より選ばれるいずれか少なくとも一種の化合物であることを特徴とする請求項 36 に記載の可溶性トロンボモジュリンの安定化方法。

SEQUENCE LISTING

<110> 旭化成株式会社 Asahi Kasei Kabushiki Kaisha

<120> 可溶性トロンボモジュリン高濃度含有製剤

Soluble Thrombomodulin high concentrated pharmaceuticals

<130> ASAHI-33

<150> JP2002-009951

<151> 2002-01-18

<160> 9

<210> 1

<211> 516

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ヒト可溶性トロンボモジュリンの部分的なアミノ酸配列

<400> 1

Met Leu Gly Val Leu Val Leu Gly Ala Leu Ala Leu Ala Gly Leu Gly

1 5 10 15

Phe Pro Ala Pro Ala Glu Pro Gln Pro Gly Gly Ser Gln Cys Val Glu

20 25 30

His Asp Cys Phe Ala Leu Tyr Pro Gly Pro Ala Thr Phe Leu Asn Ala

35 40 45

Ser Gln Ile Cys Asp Gly Leu Arg Gly His Leu Met Thr Val Arg Ser

50 55 60
Ser Val Ala Ala Asp Val Ile Ser Leu Leu Leu Asn Gly Asp Gly Gly
65 70 75 80
Val Gly Arg Arg Arg Leu Trp Ile Gly Leu Gln Leu Pro Pro Gly Cys
85 90 95
Gly Asp Pro Lys Arg Leu Gly Pro Leu Arg Gly Phe Gln Trp Val Thr
100 105 110
Gly Asp Asn Asn Thr Ser Tyr Ser Arg Trp Ala Arg Leu Asp Leu Asn
115 120 125
Gly Ala Pro Leu Cys Gly Pro Leu Cys Val Ala Val Ser Ala Ala Glu
130 135 140
Ala Thr Val Pro Ser Glu Pro Ile Trp Glu Glu Gln Gln Cys Glu Val
145 150 155 160
Lys Ala Asp Gly Phe Leu Cys Glu Phe His Phe Pro Ala Thr Cys Arg
165 170 175
Pro Leu Ala Val Glu Pro Gly Ala Ala Ala Ala Val Ser Ile Thr
180 185 190
Tyr Gly Thr Pro Phe Ala Ala Arg Gly Ala Asp Phe Gln Ala Leu Pro
195 200 205
Val Gly Ser Ser Ala Ala Val Ala Pro Leu Gly Leu Gln Leu Met Cys
210 215 220
Thr Ala Pro Pro Gly Ala Val Gln Gly His Trp Ala Arg Glu Ala Pro
225 230 235 240
Gly Ala Trp Asp Cys Ser Val Glu Asn Gly Gly Cys Glu His Ala Cys
245 250 255
Asn Ala Ile Pro Gly Ala Pro Arg Cys Gln Cys Pro Ala Gly Ala Ala
260 265 270
Leu Gln Ala Asp Gly Arg Ser Cys Thr Ala Ser Ala Thr Gln Ser Cys
275 280 285

Asn Asp Leu Cys Glu His Phe Cys Val Pro Asn Pro Asp Gln Pro Gly
290 295 300
Ser Tyr Ser Cys Met Cys Glu Thr Gly Tyr Arg Leu Ala Ala Asp Gln
305 310 315 320
His Arg Cys Glu Asp Val Asp Asp Cys Ile Leu Glu Pro Ser Pro Cys
325 330 335
Pro Gln Arg Cys Val Asn Thr Gln Gly Gly Phe Glu Cys His Cys Tyr
340 345 350
Pro Asn Tyr Asp Leu Val Asp Gly Glu Cys Val Glu Pro Val Asp Pro
355 360 365
Cys Phe Arg Ala Asn Cys Glu Tyr Gln Cys Gln Pro Leu Asn Gln Thr
370 375 380
Ser Tyr Leu Cys Val Cys Ala Glu Gly Phe Ala Pro Ile Pro His Glu
385 390 395 400
Pro His Arg Cys Gln Met Phe Cys Asn Gln Thr Ala Cys Pro Ala Asp
405 410 415
Cys Asp Pro Asn Thr Gln Ala Ser Cys Glu Cys Pro Glu Gly Tyr Ile
420 425 430
Leu Asp Asp Gly Phe Ile Cys Thr Asp Ile Asp Glu Cys Glu Asn Gly
435 440 445
Gly Phe Cys Ser Gly Val Cys His Asn Leu Pro Gly Thr Phe Glu Cys
450 455 460
Ile Cys Gly Pro Asp Ser Ala Leu Val Arg His Ile Gly Thr Asp Cys
465 470 475 480
Asp Ser Gly Lys Val Asp Gly Gly Asp Ser Gly Ser Gly Glu Pro Pro
485 490 495
Pro Ser Pro Thr Pro Gly Ser Thr Leu Thr Pro Pro Ala Val Gly Leu
500 505 510
Val His Ser Gly

515

<210> 2

<211> 1548

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ヒト可溶性トロンボモジュリン遺伝子の部分的な塩基配列

<400> 2

atgcttgggg tcctggctcct tggcgcgctg gccctggccg gcctgggggtt ccccgcaccc 60
gcagagccgc agccgggtgg cagccagtgc gtcgagcacg actgcttcgc gctctaccgc 120
ggccccgcga ctttcctcaa tgccagtcag atctgcgacg gactgcgggg ccacctaata 180
acagtgcgct cctcgggtggc tgccgatgtc atttccttgc tactgaacgg cgacggcggc 240
gttggccgcc ggcgctctg gatcggcctg cagctgccac ccggctgcgg cgaccccaag 300
cgctcgggc ccctgcgcgg cttccagtgg gttacgggag acaacaacac cagctatagc 360
aggtgggcac ggctcgacct caatggggct cccctctgcg gcccggtgtg cgtcgtgtc 420
tccgctgtg aggccactgt gccagcgag ccgatctggg aggagcagca gtgcgaagt 480
aaggccgatg gcttcctctg cgagttccac ttcccagcca cctgcaggcc actggctgtg 540
gagccggcg ccgcggctgc cgccgtctcg atcacctac gcaccccggt cgcgggccgc 600
ggagcggact tccaggcgct gccggtgggc agctccgcc cggtggctcc cctcggctta 660
cagctaatagt gcaccgcgc gcccgagcg gtccaggggc actgggcccag ggaggcgccg 720
ggcgcttggg actgcagcgt ggagaacggc ggctgcgagc acgcgtgcaa tgcgatccct 780
ggggctcccc gctgccagt cccagccggc gccgcctgc aggcagacgg gcgctcctgc 840
accgcatccg cgacgcagtc ctgcaacgac ctctgcgagc acttctgcgt tccaacccc 900
gaccagccgg gctcctactc gtgcatgtgc gagaccggct accggctggc ggccgaccaa 960
caccggtgcg aggacgtgga tgactgcata ctggagccca gtccgtgtcc gcagcgctgt 1020
gtcaacacac aggggtggctt cgagtgccac tgctacccta actacgacct ggtggacggc 1080

gagtgtgtgg agcccgtgga cccgtgcttc agagccaact gcgagtacca gtgccagccc 1140
 ctgaacaaaa ctagctacct ctgcgtctgc gccgagggt tgcgcccacat tccccacgag 1200
 ccgcacaggt gccagatggt ttgcaaccag actgcctgtc cagccgactg cgaccccaac 1260
 acccaggcta gctgtgagt ccctgaaggc tacatcctgg acgacggttt catctgcaag 1320
 gacatcgacg agtgcgaaaa cggcggttc tgctccgggg tgtgccacaa cctccccggt 1380
 accttcgagt gcatctgcgg gcccgactcg gcccttgtcc gccacattgg caccgac. t 1440
 gactccggca aggtggacgg tggcgacagc ggctctggcg agccccgcc cagcccgacg 1500
 cccggtcca ccttgactcc tccggccgtg gggctcgtgc attcgggc 1548

<210> 3

<211> 132

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ヒト可溶性トロンボモジュリンの部分的なアミノ酸配列

<400> 8

Met Leu Gly Val Leu Val Leu Gly Ala Leu Ala Leu Ala Gly Leu Gly
 1 5 10 15
 Phe Pro Asp Pro Cys Phe Arg Ala Asn Cys Glu Tyr Gln Cys Gln Pro
 20 25 30
 Leu Asn Gln Thr Ser Tyr Leu Cys Val Cys Ala Glu Gly Phe Ala Pro
 35 40 45
 Ile Pro His Glu Pro His Arg Cys Gln Met Phe Cys Asn Gln Thr Ala
 50 55 60
 Cys Pro Ala Asp Cys Asp Pro Asn Thr Gln Ala Ser Cys Glu Cys Pro
 65 70 75 80
 Glu Gly Tyr Ile Leu Asp Asp Gly Phe Ile Cys Thr Asp Ile Asp Glu
 85 90 95

Cys Glu Asn Gly Gly Phe Cys Ser Gly Val Cys His Asn Leu Pro Gly

100

105

110

Thr Phe Glu Cys Ile Cys Gly Pro Asp Ser Ala Leu Val Arg His Ile

115

120

125

Gly Thr Asp Cys

130

<210> 4

<211> 396

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ヒト可溶性トロンボモジュリン遺伝子の部分的な塩基配列

<400> 4

atgcttgggg tcctggctct tggcgcgctg gccctggcgc gcctgggggt ccccgaccgc 60
 tgcttcagag ccaactgcga gtaccagtgc cagcccctga accaaactag ctacctctgc 120
 gtctgcgcgc agggcttcgc gccattccc cagagccgc acaggtgcca gatgttttgc 180
 aaccagactg cctgtccagc cgactgcgac cccaacaccc aggctagctg tgagtgcctt 240
 gaaggctaca tcctggacga cggtttcatc tgcacggaca tcgacgagtgc gaaaaacggc 300
 ggcttctgct ccgggggtgt ccacaacctc cccggtacct tcgagtgcac ctgcggggccc 360
 gactcggccc ttgtccgcca cattggcacc gactgt 396

<210> 5

<211> 516

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ヒト可溶性トロンボモジュリンの部分的なアミノ酸配列

<400> 5

Met Leu Gly Val Leu Val Leu Gly Ala Leu Ala Leu Ala Gly Leu Gly
1 5 10 15
Phe Pro Ala Pro Ala Glu Pro Gln Pro Gly Gly Ser Gln Cys Val Glu
20 25 30
His Asp Cys Phe Ala Leu Tyr Pro Gly Pro Ala Thr Phe Leu Asn Ala
35 40 45
Ser Gln Ile Cys Asp Gly Leu Arg Gly His Leu Met Thr Val Arg Ser
50 55 60
Ser Val Ala Ala Asp Val Ile Ser Leu Leu Leu Asn Gly Asp Gly Gly
65 70 75 80
Val Gly Arg Arg Arg Leu Trp Ile Gly Leu Gln Leu Pro Pro Gly Cys
85 90 95
Gly Asp Pro Lys Arg Leu Gly Pro Leu Arg Gly Phe Gln Trp Val Thr
100 105 110
Gly Asp Asn Asn Thr Ser Tyr Ser Arg Trp Ala Arg Leu Asp Leu Asn
115 120 125
Gly Ala Pro Leu Cys Gly Pro Leu Cys Val Ala Val Ser Ala Ala Glu
130 135 140
Ala Thr Val Pro Ser Glu Pro Ile Trp Glu Glu Gln Gln Cys Glu Val
145 150 155 160
Lys Ala Asp Gly Phe Leu Cys Glu Phe His Phe Pro Ala Thr Cys Arg
165 170 175
Pro Leu Ala Val Glu Pro Gly Ala Ala Ala Ala Val Ser Ile Thr
180 185 190
Tyr Gly Thr Pro Phe Ala Ala Arg Gly Ala Asp Phe Gln Ala Leu Pro
195 200 205

Val Gly Ser Ser Ala Ala Val Ala Pro Leu Gly Leu Gln Leu Met Cys
210 215 220
Thr Ala Pro Pro Gly Ala Val Gln Gly His Trp Ala Arg Glu Ala Pro
225 230 235 240
Gly Ala Trp Asp Cys Ser Val Glu Asn Gly Gly Cys Glu His Ala Cys
245 250 255
Asn Ala Ile Pro Gly Ala Pro Arg Cys Gln Cys Pro Ala Gly Ala Ala
260 265 270
Leu Gln Ala Asp Gly Arg Ser Cys Thr Ala Ser Ala Thr Gln Ser Cys
275 280 285
Asn Asp Leu Cys Glu His Phe Cys Val Pro Asn Pro Asp Gln Pro Gly
290 295 300
Ser Tyr Ser Cys Met Cys Glu Thr Gly Tyr Arg Leu Ala Ala Asp Gln
305 310 315 320
His Arg Cys Glu Asp Val Asp Asp Cys Ile Leu Glu Pro Ser Pro Cys
325 330 335
Pro Gln Arg Cys Val Asn Thr Gln Gly Gly Phe Glu Cys His Cys Tyr
340 345 350
Pro Asn Tyr Asp Leu Val Asp Gly Glu Cys Val Glu Pro Val Asp Pro
355 360 365
Cys Phe Arg Ala Asn Cys Glu Tyr Gln Cys Gln Pro Leu Asn Gln Thr
370 375 380
Ser Tyr Leu Cys Val Cys Ala Glu Gly Phe Ala Pro Ile Pro His Glu
385 390 395 400
Pro His Arg Cys Gln Met Phe Cys Asn Gln Thr Ala Cys Pro Ala Asp
405 410 415
Cys Asp Pro Asn Thr Gln Ala Ser Cys Glu Cys Pro Glu Gly Tyr Ile
420 425 430
Leu Asp Asp Gly Phe Ile Cys Thr Asp Ile Asp Glu Cys Glu Asn Gly

435 440 445
 Gly Phe Cys Ser Gly Val Cys His Asn Leu Pro Gly Thr Phe Glu Cys
 450 455 460
 Ile Cys Gly Pro Asp Ser Ala Leu Ala Arg His Ile Gly Thr Asp Cys
 465 470 475 480
 Asp Ser Gly Lys Val Asp Gly Gly Asp Ser Gly Ser Gly Glu Pro Pro
 485 490 495
 Pro Ser Pro Thr Pro Gly Ser Thr Leu Thr Pro Pro Ala Val Gly Leu
 500 505 510
 Val His Ser Gly
 515

<210> 6

<211> 1548

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ヒト可溶性トロンボモジュリン遺伝子の部分的な塩基配列

<400> 6

atgcttgggg tcctggtcct tggcgcgctg gccctggccg gcctggggtt ccccgcaccc 60
 gcagagccgc agccgggtgg cagccagtgc gtcgagcacg actgcttcgc gctctaccgc 120
 ggccccgcga ccttcctcaa tgccagtcag atctgcgacg gactgcgggg ccacctaattg 180
 acagtgcgct cctcggtggc tgccgatgtc atttccttgc tactgaacgg cgacggcggc 240
 gttggccgcc ggcgccctctg gatcggcctg cagctgccac ccggctgcgg cgaccccaag 300
 cgccctcgggc ccctgcgcgg ctccagtggt gttacgggag acaacaacac cagctatagc 360
 aggtgggcac ggctcgacct caatggggct cccctctgcg gcccgttgtg cgtcgctgtc 420
 tccgctgctg aggccactgt gccagcgcgag ccgatctggg aggagcagca gtgcgaagtg 480

aaggccgatg gcttcctctg cgagttccac ttcccagcca cctgcaggcc actggctgtg 540
gagcccggcg ccgcggctgc cgccgtctcg atcacctacg gcaccccggt cgcgggccgc 600
ggagcggact tccaggcgct gccggtgggc agctccgccg cggtaggctcc cctcggtta 660
cagctaattgt gcaccgcgcc gcccgagcgc gtccaggggc actgggcccag ggaggcgccg 720
ggcgcttggg actgcagcgt ggagaacggc ggctgcgagc acgcgtgcaa tgcgatccct 780
ggggctcccc gctgccagtg cccagccggc gccgccctgc aggcagacgg gcgctcctgc 840
accgcatccg cgacgcagtc ctgcaacgac ctctgcgagc atttctgctg tcccaacccc 900
gaccagccgg gctcctactc gtgcatgtgc gagaccggct accggctggc ggccgaccaa 960
caccggtgcg aggacgtgga tgactgcata ctggagccca gtccgtgtcc gcagcgctgt 1020
gtcaacacac aggggtggctt cgagtgccac tgctacccta actacgacct ggtggacggc 1080
gagtgtgtgg agcccgtgga cccgtgcttc agagccaact gcgagtacca gtgccagccc 1140
ctgaacaaa ctagctacct ctgcgtctgc gccgagggtc tcgcgcccat tccccacgag 1200
ccgcacaggt gccagatgtt ttgcaaccag actgcctgtc cagccgactg cgaccccaac 1260
accaggcta gctgtgagt cctgaaggc tacatcctgg acgacggttt catctgcacg 1320
gacatcgacg agtgcgaaaa cggcggcttc tgctccgggg tgtgccacaa cctccccggt 1380
accttcgagt gcatctgcgg gcccgactcg gcccttgccc gccacattgg caccgactgt 1440
gactccggca aggtggacgg tggcgacagc ggctctggcg agccccgcc cagcccgacg 1500
cccggtcca ccttgactcc tccggccgtg gggctcgtgc attcgggc 1548

<210> 7

<211> 132

212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ヒト可溶性トロノボモジュリンの部分的なアミノ酸配列

<400> 7

Met Leu Gly Val Leu Val Leu Gly Ala Leu Ala Leu Ala Gly Leu Gly

1

5

10

15

Phe Pro Asp Pro Cys Phe Arg Ala Asn Cys Glu Tyr Gln Cys Gln Pro

20

25

30

Leu Asn Gln Thr Ser Tyr Leu Cys Val Cys Ala Glu Gly Phe Ala Pro

35

40

45

Ile Pro His Glu Pro His Arg Cys Gln Met Phe Cys Asn Gln Thr Ala

50

55

60

Cys Pro Ala Asp Cys Asp Pro Asn Thr Gln Ala Ser Cys Glu Cys Pro

65

70

75

80

Glu Gly Tyr Ile Leu Asp Asp Gly Phe Ile Cys Thr Asp Ile Asp Glu

85

90

95

Cys Glu Asn Gly Gly Phe Cys Ser Gly Val Cys His Asn Leu Pro Gly

100

105

110

Thr Phe Glu Cys Ile Cys Gly Pro Asp Ser Ala Leu Ala Arg His Ile

115

120

125

Gly Thr Asp Cys

130

<210> 8

<211> 396

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ヒト可溶性トロンボモジュリン遺伝子の部分的な塩基配列

<400> 8

atgcttgggg tcctggtcct tggcgcgctg gccctggccg gcctgggggtt ccccgaccgc 60
tgcttcagag ccaactgcga gtaccagtgc cagcccctga accaaactag ctacctctgc 120
gtctgcgccg agggcttcgc gccattccc cagagccgc acaggtgcc a gatgttttgc 180

aaccagactg cctgtccagc cgactgcgac cccaacaccc aggctagctg tgagtgcct 240
gaaggctaca tcctggacga cggtttcac tgcacggaca tcgacgagtg cgaaaacggc 300
ggctttctgct ccgggggtgtg ccacaacctc cccggtacct tcgagtgcac ctgcggggccc 360
gactcggccc ttgcccgcga cattggcacc gactgt 396

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 変異用の合成DNA

<400> 9

aatgtggcgg gcaagggccg a

21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/00339

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ A61K38/36, 9/08, 47/10, 47/18, 47/26, A61P1/16, 3/10, 7/00,
7/02, 9/00, 9/08, 9/10, 15/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ A61K38/00-58, 9/00-72, 47/00-48, A61J1/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2003
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2003	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2003

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN), REGISTRY (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 10-72364 A (Mochida Pharmaceutical Co., Ltd.), 17 March, 1998 (17.03.98), Full text; particularly, pharmaceutical preparation examples 5, 6 (Family: none)	1-4, 7-34
X Y	JP 6-321805 A (Asahi Chemical Industry Co., Ltd.), 22 November, 1994 (22.11.94), Full text; particularly, Claims 1 to 11 (Family: none)	35 1-34, 36, 37
Y	JP 62-289529 A (Hoechst AG.), 16 December, 1987 (16.12.87), Full text; particularly, Claims 1 to 7 & DE 3618217 C1	1-4, 7-34, 36, 37

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
07 April, 2003 (07.04.03)

Date of mailing of the international search report
22 April, 2003 (22.04.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/00339

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 9-124481 A (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 13 May, 1997 (13.05.97), Full text; particularly, Par. No. [0004] (Family: none)	1, 5-9, 15-18, 20, 22, 23, 25-28, 31-34
Y	GB 2015340 A (YAMANOUCHI PHARMACEUTICAL CO., LTD.), 12 September, 1979 (12.09.79), Full text; particularly, Claims 1 to 14; page 1, lines 72 to 77 & JP 55-48064 A	1, 6-9, 15-18, 20, 22, 23, 25-28, 31-34
A	EP 1029548 A (ASAHI KASEI KOGYO KABUSHIKI KAISHA), 23 August, 2000 (23.08.00), Full text & WO 99/18994 A1	1-37

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/00339

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Claim 1 relates to a method for inhibiting soluble thrombomodulin from foaming by the addition of any of compounds (a) to (c), while claims 35-37 relate to a method for stabilizing soluble thrombomodulin by the addition of any of compounds (1) to (4). The matter common to both is "a soluble thrombomodulin preparation", but the preparation is publicly known as disclosed in the documents cited below and is therefore not considered as a feature of invention. Further, Claim 1 and claims 35-37 are not considered as having a common problem which had not been solved until the time of filing.

Thus, claim 1 and claims 35-37 are not considered as relating to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ A61K38/36, 9/08, 47/10, 47/18, 47/26, A61P1/16, 3/10, 7/00, 7/02, 9/00, 9/08, 9/10, 15/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ A61K38/00-58, 9/00-72, 47/00-48, A61J1/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2003年
日本国登録実用新案公報	1994-2003年
日本国実用新案登録公報	1996-2003年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN)
REGISTRY (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP 10-72364 A(持田製薬株式会社)1998.03.17, 全文, 特に製剤例 5,6 (ファミリーなし)	1-4, 7-34
X Y	JP 6-321805 A(旭化成工業株式会社)1994.11.22, 全文, 特に請求 項1-11(ファミリーなし)	35 1-34, 36, 37
Y	JP 62-289529 A(ヘキスト・アクチエンゲゼルシャフト)1987.12.16 全文, 特に請求項1-7 & DE 3618217 C1	1-4, 7-34, 36, 37

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

0 7 . 0 4 . 0 3

国際調査報告の発送日

22.04.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
郵便番号100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

浜田 麻子



4 C

2 9 3 8

電話番号 03-3581-1101 内線 3451

C (続き) . 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP 9-124481 A(武田薬品工業株式会社)1997.05.13, 全文, 特に段落番号【0004】 (ファミリーなし)	1, 5-9, 15-18, 20, 22, 23, 25- 28, 31-34
Y	GB 2015340 A(YAMANOUCHI PHARMACEUTICAL CO., LTD.)1979.09.12, 全文, 特に請求項1-14, 第1頁第72-77行 & JP 55-48064 A	1, 6-9, 15-18, 20, 22, 23, 25- 28, 31-34
A	EP 1029548 A(ASAHI KASEI KOGYO KABUSHIKI KAISYA)2000.08.23, 全文 & WO 99/18994 A1	1-37

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところこの国際調査機関は認めた。

本願の請求の範囲1に係る発明は、(a)～(c)のいずれかの化合物を配合する可溶性トロンボモジュリンの起泡抑制方法であり、一方、請求の範囲35-37に係る発明は、(1)～(4)のいずれかを添加する可溶性トロンボモジュリンの安定化方法であるところ、両者の共通部は、「可溶性トロンボモジュリンを含有する製剤」であると認められるが、下記文献に記載のとおり、当該製剤は公知であるため、当該構成は発明の主要部と見ることができない。また、両者が出願時まで未解決であった共通の課題をもつものとも認められない。
したがって、本願の請求の範囲35-37に係る発明は、本願の請求の範囲1に係る発明と単一の一般的発明概念を形成するように関連している一群の発明とは認められない。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。